

乙型肝炎病毒E抗原结合蛋白E-19的猴同源基因的克隆化与序列分析

吴煜, 成军, 陆荫英, 王琳, 刘妍, 张健, 李克

吴煜, 成军, 陆荫英, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 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

吴煜, 女, 1968-11-02生, 黑龙江人, 主治医师, 军医进修学院内科传染病专业2001级硕士学位研究生, 主要从事传染病临床及病毒性肝炎的基础研究。国家自然科学基金资助项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288

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: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Identification and sequence analysis of a *Macaca fascicularis* homologous gene to human hepatitis B virus e antigen binding protein E-19

Yu Wu, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li

Yu Wu, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To explore the biological and immunoregulatory functions of hepatitis B e antigen (HBeAg) which is a secreted nonparticulate version of the viral nucleocapsid hepatitis B core antigen (HBcAg), yeast-two hybrid technique was performed to seek proteins in hepatocytes interacting with HBeAg and a novel gene named as E-19 was identified. To clone E-19 homologous gene from different species, a *Macaca fascicularis* homologous gene E-19 was identified by bioinformatics.

METHODS: HBeAg bait plasmid was constructed and transformed into yeast AH109 (a type). AH109 was mated with yeast cells Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2×YPDA medium. Plasmid of true positive blue colonies were extracted and analyzed by DNA sequencing and a new human gene E-19 was identified. A *Macaca*

fascicularis homologous gene E-19 was identified by bioinformatics methods.

RESULTS: A *Macaca fascicularis* homologous gene E-19 was identified by bioinformatics. The *Macaca fascicularis* homologous gene E-19 was consisted of 378 nt and encoded a protein of 125 aa.

CONCLUSION: Human gene E-19, a HBeAg interacting proteins in hepatocytes, is successfully cloned by yeast-two hybrid technique and a *Macaca fascicularis* homologous gene E-19 is identified by bioinformatics.

Wu Y, Cheng J, Lu YY, Wang L, Liu Y, Zhang J, Li K. Identification and sequence analysis of a *Macaca fascicularis* homologous gene to human hepatitis B virus e antigen binding protein E-19. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):805-808

摘要

目的: 乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)对HBV的感染和复制都不是必须的, 普遍认为他与HBV引起免疫耐受, 免疫系统功能障碍有关. 应用酵母双杂交技术我们克隆了人肝细胞cDNA文库中与HBeAg相互作用蛋白的基因E-19, 应用生物信息学技术克隆猴的E-19同源基因.

方法: 应用酵母双杂交系统3, 将多聚酶链反应(PCR)法扩增的HBeAg基因连接入酵母表达载体pGBKT7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人肝cDNA文库质粒pACT2的酵母细胞Y187进行配合, 提取阳性菌落并测序, 确定人E-19基因序列, 利用生物信息学技术克隆猴的E-19同源基因, 并进行编码产物的序列分析.

结果: 成功克隆出人的HBeAg结合蛋白新基因E-19. 应用生物信息学技术, 确定克隆了猴E-19同源基因, 编码基因全长378 nt, 编码产物由125 aa组成.

结论: 成功克隆出人的HBeAg的肝细胞结合蛋白E-19基因, 并发现、确定了猴E-19的同源基因, 为研究E-19基因的结构与功能、表达与调控、生物学意义以及在病毒性肝炎发病机制中的作用奠定了基础.

吴煜, 成军, 陆荫英, 王琳, 刘妍, 张健, 李克. 乙型肝炎病毒E抗原结合蛋白E-19的猴同源基因的克隆化与序列分析. 世界华人消化杂志 2004;12(4):805-808
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/805.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染的慢性化机制是目前乙型肝炎

研究领域中的重要课题,虽然涉及多方面的因素,其中之一就是与HBeAg的免疫学调节作用有关。HBeAg在慢性乙型肝炎发病机制中的作用和分子生物学机制目前还不十分清楚^[1-3]。HBeAg可阻断细胞毒性T淋巴细胞优先清除对HBcAg特异的Th1细胞及Th1细胞介导的抗-HBc抗体反应,使免疫应答转换为Th2细胞亚型,使HBV逃避免疫清除,感染慢性化^[4-7]。为了阐明HBeAg在慢性乙型肝炎发病机制中的作用,必须首先阐明在肝细胞中HBeAg结合的肝细胞蛋白类型,我们应用酵母双杂交技术,从肝细胞的cDNA文库中筛选到一个HBeAg的结合蛋白新基因,命名为E-19,为了寻找不同种属生物的E-19同源基因,我们利用生物信息学技术,鉴定、克隆了猴E-19基因,对于其基因和编码产物序列进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料 AH109 酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4^Δ, gal80^Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lac Z MEL1)、预转化的cDNA肝文库(Y187)、pGBKT7-BD、pGADT7-AD克隆载体及酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade等培养基、X-α-gal 购于Clontech公司。大Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、Eco R I和Pst I 购于Takara生物公司。IPTG及X-α-Gal 及pGEM-T载体、RT-PCR试剂盒购于Promega公司。HBeAg扩增引物(P1 5' - GAA TTC ATG CAA CTT TTT CAC CTC TG -3', p2 5' - CTG CAG GCC CCA AAG CCA CCC AAG GC-3', 新基因E-19扩增引物(P3 5' -GAA TTC ATG TCA TGG ACA CCC ACC TC -3', P4 5' - GGA TCC AGA AAG AAA CAG GGT GAG GG -3' 由合成及DNA测序由上海博亚公司承担。

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交筛选 PCR扩增HBeAg基因与pGBKT7载体连接构建表达载体,转染酵母细胞AH109并培养至 $1 \times 10^{12}/L^{-1}$,与1 ml(1×10^6)的肝文库酵母细胞配合,生长6-18 d后挑取真阳性菌落。应用逆转录RT-PCR扩增人E-19基因的全序列。

1.2.2 猴E-19基因的克隆化 以人的HBeAg结合蛋白E-19基因序列作为参照,应用在线核苷酸序列同源性的比对软件(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast),对于核苷酸数据库nr中收录的核苷酸序列进行同源性比对,并确定猴E-19的同源基因。

2 结果

2.1 pGBKT7-HBeAg重组诱饵质粒的构建及表达 成功扩增出HBeAg基因片段,连接到pGBKT7载体中酶切鉴定结果正确。诱饵质粒转化酵母AH109株。

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果 配合后筛选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有

X-α-半乳糖(X-α-gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落,在GenBank中寻找同源序列。

2.3 新基因全序及表达载体的克隆及重组结果 RT-PCR方法成功克隆出人E-19新基因的完整序列,大小为351 bp, GenBank注册号AF529373(图1)。

2.4 人E-19猴同源基因的克隆化 利用生物信息学技术,发现、确定了猴E-19的同源基因,为研究E-19基因的结构与功能、表达与调控、生物学意义以及在病毒性肝炎发病机制中的作用奠定了基础(图2)。

2.5 人与猴E-19基因序列及编码产物序列的比较 人与猴E-19基因序列的比较,有13 nt位点的核苷酸序列不同,同源性为96.56% (365/378);人与猴E-19基因编码产物序列的比较,有6 aa位点的氨基酸残基序列不同,同源性为95.20% (119/125)。另外,人与猴E-19基因序列及编码产物序列的比较,在人E-19基因序列的255-256 nt之间,猴E-19基因中有一段27 nt的核苷酸序列的插入,即猴E-19蛋白中有一段9 aa的氨基酸残基序列的插入,但是这种变化的生物学意义需要进行深入的研究(图3, 4)。

```

M S W T P T S C S C G L G D G
1 ATG TCA TGG ACA CCC ACC TCT TGT TCC TGC GGC CTC GGT GAT GGC
I G H I L G V Q R R P T R A R
46 ATA GGT CAC ATT TTG GGA GTT CAG AGG AGG CCT ACA AGG GCA AGG
S D G R A R L V L R A S L S L
91 TCA GAT GGC AGA GCA AGG TTG GTC CTC AGG GCC TCT CTA AGC CTT
R A P P L L G L G C L V N C H
136 AGG GCC CCT CCT CTC CTT GGC CTT GGC TGT TTG GTT AAC TGT CAC
L P L R A S A L Y L F P S S Q
181 CTT CCA CTC AGG GCC TCT GCT CTA TAT CTA TTC CCT TCC AGC CAG
T G R W G L P P T P E D E D K
226 ACT GGC AGA TGG GGG CTT CCC CCT ACC CCT GAG GAT GAG GAC AAG
P L G Q F S V P V L L P W A A
271 CCC CTC GGC CAG TTC AGC GTT CCC GTG CTT CTC CCT TGG GCA GCC
S L L S P S P C F F L *
316 TCT CTC TTG AGC CCC TCA CCC TGT TTC TTT CTG TGA

```

图1 人E-19新基因序列(GenBank号: AF529373)。

```

1 ATGTCATGGACACCCACCTCTTGTTCCTGCGGCCTCGGTGATGGC
M S W T P T S C S C G L G D G
46 ATAGGTCACATTTTGAGAGTTCAGAGGAGGCCTACAAGGCAAGG
I G H I L R V Q R R P T R A R
91 TCAGATGGCAGAGCAAGGTTGGTCTCAGGCGCTCACTAAGCCTT
S D G R A R L V L R A S L S L
136 AGGGCCCTCCTCTCCTTGCCCTTGCGTGTGTTGTTAGCTGTGAC
R A P P L L G L G C L V S C H
181 CTCCCACTCAGGGCCTCTGCTATGCTATTCCTTCCAGCCAG
L P L R A S A L C L F P S S Q
226 ACTAGCAGATGGGCGCTCCCGCTACCCCTACTTTTGCATGGCA
T S R W G L P P T P T F C M A
271 GCAGGTACCCCTGAGGACAAGGACAAGCCCTTGCCAGTTCAGT
A G T P E D K D K P L G Q F S
316 GTTCCCATGCTTCTCCCTTGGGACGCTCTCTTGTAGCCCTCA
V P M L L P W A A S L L S P S
361 CCCTGTTTCTTCTGTGA 378
P C F F L *

```

图2 E-19的猴同源基因序列及其编码产物。

人 ATGTCATGGACACCCACCTCTTGTTCCTGCGGCCTCGGTGATGGC
 猴 ATGTCATGGACACCCACCTCTTGTTCCTGCGGCCTCGGTGATGGC

人 ATAGGTCACATTTTGGGAGTTCAGAGGAGGCCTACAAGGGCAAGG
 猴 ATAGGTCACATTTTGGGAGTTCAGAGGAGGCCTACAAGGGCAAGG

人 TCAGATGGCAGAGCAAGGTTGGTCCTCAGGGCCTCTCTAAGCCTT
 猴 TCAGATGGCAGAGCAAGGTTGGTCCTCAGGGCCTCTCTAAGCCTT

人 AGGGCCCCCTCTCTCCTTGGCCTTGGCTGTTTGGTTAACTGTCAC
 猴 AGGGCCCCCTCTCTCCTTGGCCTTGGCTGTTTGGTTAGCTGTCAC

人 CTTCCACTCAGGGCCTCTGCTCTATATCTATTCCCTTCCAGCCAG
 猴 CTTCCACTCAGGGCCTCTGCTCTATGTCTATTCCCTTCCAGCCAG

人 ACTGGCAGATGGGGGCTTCCCCCTACCCCT-----
 猴 ACTAGCAGATGGGGCCTCCCCCTACCCCTACTTTTTGCATGGCA

人 -----GAGGATGAGGACAAGCCCTCGGCCAGTTCAGC
 猴 GCAGGTACCCTGAGGACAAGGACAAGCCCTTGGCCAGTTCAGT

人 GTTCCCGTGCTTCTCCCTTGGGCAGCCTCTCTCTTGAGCCCCTCA
 猴 GTTCCCATGCTTCTCCCTTGGGCAGCCTCTCTCTTGAGCCCCTCA

人 CCCTGTTTCTTTCTGTGA
 猴 CCCTGTTTCTTTCTGTGA

图 3 人和猴 E-19 基因核苷酸序列的比较。

人 MSWTPTSCSCGLGDGIGHILGVQRRPTRAR
 猴 MSWTPTSCSCGLGDGIGHILRVQRRPTRAR

人 SDGRARLVLRASLSRAPPLGLGCLVNCH
 猴 SDGRARLVLRASLSRAPPLGLGCLV\$CH

人 LPLRASALYLFPSQTGRWGLPPTP-----
 猴 LPLRASALCLFPSQTSRWGLPPTPTFCMA

人 ----EDEDKPLGQFSVPVLLPWAASLLSPS
 猴 AGTPEDKDKPLGQFSVPMLLPWAASLLSPS

人 PCFFL*
 猴 PCFFL*

图 4 人和猴 E-19 基因编码蛋白序列的比较。

3 讨论

全世界有 3.5 亿人处于 HBV 慢性感染状态, 其中有相当部分要发展为肝硬化、肝细胞癌^[8-14]。HBV 感染之后, 一部分患者转为慢性感染, 而另一部分患者可以自愈。关于 HBV 感染者自愈的机制以及影响因素等始终是人们关注的焦点, 试图通过比较 HBV 感染之后不同的结局之间的差别, 阐明 HBV 感染慢性化的免疫学机制和分子生物学机制, 但是到目前为止, 关于 HBV 感染慢性化的分子生物学机制仍然不十分清楚。HBV 感染后

的结局, 一方面取决于病毒的因素, 更重要的是取决于 HBV 感染者的免疫学状态和反应机制^[15-24]。长期以来, HBeAg 的免疫学调节作用在 HBV 慢性感染的形成过程中的重要地位成为人们关注的一个关键环节, 但是具体的机制还不清楚。为了发现 HBeAg 在 HBV 感染慢性化中的可能的意义和机制, 我们利用研究蛋白-蛋白相互作用的酵母双杂交技术, 对于 HBeAg 在肝细胞中结合的蛋白类型进行了细致有效的筛选, 从中发现了一些有益的线索。其中发现的 HBeAg 结合蛋白 E-19 时一种从来没有研究报道的新基因类型, 关于 E-19 基因的结构与功能、表达与调控、生物学意义以及在病毒性肝炎发病机制中的作用还不清楚, 需要进行系统、深入的研究。为了研究不同种属的 E-19 基因的结构和功能, 我们利用生物信息学技术, 克隆、鉴定了猴 E-19 的同源基因。除了与人 E-19 基因序列和编码产物序列具有高度的同源性之外, 在猴 E-19 基因中还发现了一段 27 nt 的 DNA 片段的插入, 其生物学意义有待于进一步的研究证实。

不同种属生物的基因克隆化以及不同种属生物的基因组计划的开展, 积累了大量的不同种属生物的基因核苷酸序列, 形成了一个庞大的数据库, 同时为了配合这些核苷酸序列的分析建立了功能强大的计算机分析软件。核苷酸数据库的建立和计算机分析技术的结合, 开辟了生物学研究的新的领域, 并逐渐形成了生物信息学(bioinformatics)新兴学科^[25-26]。生物信息学理论和技术的出现, 极大地加速了基因的分子生物学的发展, 同时为生命科学研究提供了前所未有的新的机遇。目前生物信息学技术已然成为基因的分子生物学领域不可或缺的技术手段, 甚至在当今时代, 仅从核苷酸序列数据库的分析入手, 就可以获得大量有价值的信息, 甚至可以直接鉴定、克隆新的基因。根据不同种属生物基因序列高度同源性的原理, 应用生物信息学技术克隆鉴定新的基因的研究结果越来越多, 已经成为基因的分子生物学领域的重要环节。我们曾经应用分子生物学与生物信息学的原理和技术, 应用核苷酸数据库结合计算机分析技术, 克隆了利什曼原虫的表面蛋白基因新基因^[27-31]。同时, 我们在克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白人 HCBP6 基因的同时, 利用分子生物学技术和生物信息学技术相结合的方法, 克隆了不同种属的 HCBP6 的基因序列, 本文同样利用分子生物学技术和生物信息学技术相结合的原理, 克隆、鉴定了猴 E-19 的编码基因, 所有这些研究结果充分说明了生物信息学技术在现代基因的分子生物学研究领域的重要作用 and 地位^[32-38]。E-19 基因不同生物种属同源基因序列克隆化成功和结构的比较, 必将促进对于 E-19 新基因结构和功能的研究和认识, 最终为阐明 HBV 感染的发病机制做出贡献。

4 参考文献

- 1 Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to

- the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-2021
- 2 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:218-222
 - 3 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:178-187
 - 4 Wan K, Tang S, Gong H. Relationship between T cell subgroups and HBV markers in the patients with chronic hepatitis B. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 1999;24:590
 - 5 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
 - 6 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral Res* 2001;52:99-111
 - 7 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
 - 8 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
 - 9 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
 - 10 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
 - 11 Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, Kajiya Y, Takeda Y, Higashi S, Hamasaki K, Nakao K, Nakata K, Eguchi K. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:2663-2668
 - 12 Miranda J, Cabezas C. Hepatitis B among health workers. *Rev Gastroenterol Peru* 2001;21:128-135
 - 13 Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-486
 - 14 Marx G, Martin SR, Chicoine JF, Alvarez F. Long-term follow-up of chronic hepatitis B virus infection in children of different ethnic origins. *J Infect Dis* 2002;186:295-301
 - 15 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002;76:8609-8620
 - 16 Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin- α 1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002;9:280-287
 - 17 Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
 - 18 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Nondeletional T-cell receptor transgenic mice: model for the CD4(+) T-cell repertoire in chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2000;74:7587-7599
 - 19 Jiang R, Lu Q, Hou J. Polarized populations of T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2000;80:741-744
 - 20 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and eantigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
 - 21 Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Grner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999;116:650-657
 - 22 Papatheodoris GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
 - 23 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
 - 24 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
 - 25 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:378-384
 - 26 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息技术与新基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:474-477
 - 27 成军, 斯崇文, 王勤环. 硕大利什曼原表面蛋白 "无鞭毛体蛋白(amastin)" 的基因克隆化与序列分析. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2000;18:30-32
 - 28 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 墨西哥利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. *中国人兽共患病杂志* 2000;16:39-41
 - 29 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 巴西利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. *寄生虫与医学昆虫学报* 2000;7:193-197
 - 30 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因的克隆化与序列分析. *中华传染病杂志* 2001;19:27-31
 - 31 成军, 钟彦伟, 刘妍, 杨继珍, 董菁. 亚马逊利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. *中国地方病杂志* 2001;20:175-177
 - 32 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:385-388
 - 33 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001;9:1379-1383
 - 34 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002;82:673-677
 - 35 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 邵得志, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因. *中华实验和临床病毒学杂志* 2002;16:351-354
 - 36 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
 - 37 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 牛丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. *中国人兽共患病杂志* 2003;19:73-76
 - 38 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 猪丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. *生物学杂志* 2003;20:10-13