

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000326

乙型肝炎病毒不同基因型 DNA 聚合酶 对病毒复制水平的影响

罗英英, 胡接力, 陈江燕, 黄 荣, 黄爱龙

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究不同基因型聚合酶(polymerase, pol)复制乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)DNA 的能力是否存在差异。**方法:**采用不依赖酶切和连接的克隆(restriction digestion and ligation-independent cloning, RLIC)方法和 HBV 聚合酶反式互补技术表达并检测 A、B、C、D 4 种基因型聚合酶复制 HBV DNA 的情况。**结果:**(1)反式互补技术可使 A、B、C、D 型 HBV 重新获得表达, HBV DNA 量分别为 $A=(63.03 \pm 8.03) \times 10^5$ copies/ μ l, $B=(23.23 \pm 3.53) \times 10^5$ copies/ μ l, $C=(17.63 \pm 1.25) \times 10^5$ copies/ μ l, $D=(75.73 \pm 9.43) \times 10^5$ copies/ μ l。(2)HBV 不同基因型聚合酶之间复制 HBV 能力存在差异, $F_{(4,10)}=91.88, P=0.000$ 。(3)A 型和 D 型聚合酶复制 HBV 能力强于 B 型和 C 型聚合酶, 差异有统计学意义, $P_{(A,B)}=0.001, P_{(A,C)}=0.001, P_{(B,D)}=0.001, P_{(C,D)}=0.001$ 。**结论:**HBV 不同基因型聚合酶之间复制 HBV 能力存在差异;为深入研究不同基因型在地理分布、所致疾病严重性等方面提供了有用信息并奠定了坚实的基础。

【关键词】基因型;聚合酶;乙型肝炎病毒 DNA**【中图分类号】**R512.62**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-02-20

Influence of HBV polymerase on virus replication with different genotypes

Luo Yingying, Hu Jieli, Chen Jiangyan, Huang Rong, Huang Ailong

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate hepatitis B virus (HBV) DNA levels with polymerase of HBV genotypes A, B, C and D. **Methods:** The method of restriction digestion and ligation-independent cloning (RLIC) and trans-complementation by HBV polymerase was used to express and test HBV DNA levels with four genotypes. **Results:** (1) HBV expressed again after HBV polymerase trans-complementation. HBV DNA: $A=(63.03 \pm 8.03) \times 10^5$ copies/ μ l, $B=(23.23 \pm 3.53) \times 10^5$ copies/ μ l, $C=(17.63 \pm 1.25) \times 10^5$ copies/ μ l, $D=(75.73 \pm 9.43) \times 10^5$ copies/ μ l. (2) There were differences in HBV DNA levels among different genotype polymerases, $F_{(4,10)}=91.88, P=0.000$. (3) HBV DNA levels were higher in genotype D and A than in genotype B and C, $P_{(A,B)}=0.001, P_{(A,C)}=0.001, P_{(B,D)}=0.001, P_{(C,D)}=0.001$. **Conclusion:** HBV DNA levels with polymerase of hepatitis B virus genotypes A, B, C and D were different; the mechanism of differences remains to be further studied.

【Key words】genotype; polymerase; hepatitis B virus DNA

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)可引起包括从无症状性肝炎、急性无黄疸型肝炎到重症暴发性肝炎等一系列严重程度不等的肝脏相关疾病^[1]。同样,慢性乙型肝炎的临床预后也是各不相同的^[2-4]。与 HBV 感染预后相关的病毒因素主要包括 HBe Ag,

HBV DNA, 基因型和 HBV 基因突变^[5-8]。根据基因序列同源性将 HBV 分为 10 个基因型^[9]。我国存在 A、B、C、D 4 种基因型。不同基因型地理分布及引起肝脏相关疾病严重程度具有显著差异^[5-6, 10]。临床调查研究显示不同基因型 HBV 感染者血清 HBV DNA 水平存在显著差异^[6-8]。聚合酶是影响病毒复制的重要因素^[1]。目前,尚未有体外实验来证实基因型是否影响病毒滴度。本文通过聚合酶反式互补技术检测不同基因型聚合酶 HBV DNA 的复制水平情况,探讨不同基因型聚合酶之间复制 HBV DNA 水平是否

作者介绍: 罗英英, Email: luoyingying89@163.com,

研究方向: 乙肝病毒耐药机制。

通信作者: 胡接力, Email: hujieli1977@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81000732); 重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2011jjA10005)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000326.html>

存在差异,以揭示在体外基因型是否能够影响病毒滴度水平。

1 材料与方法

1.1 材料

pCH9/3091 质粒由第三军医大学兰林博士惠赠,在德国 Nassal 实验室构建,含有 HBV(D 型)1.1 倍全基因组 DNA,由 CMV 启动子驱动,转入肝源细胞后可支持 HBV 复制。含有各基因型 HBV1.1 倍体的质粒及 HBV1.1P 质粒由本实验室构建并保存,HepG2 细胞为本实验室保存;胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,DNase I、小量抽提试剂盒购自 Promega 公司,PCR 产物纯化试剂盒、地高辛标记抗体检测试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II)及转染试剂(X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent)购自 Roche 公司;本文所用 PCR 引物合成于上海 Invitrogen 公司,引物序列见表 1。

表 1 引物及其序列

Tab.1 Sequences of primers

引物	序列(5' → 3')
F _{pol}	CTGGCTAGCGAAATGCCCCTATCTTCAACACTTCCGGA
R _{pol}	CGAGACCGAGGAGAGGGTTATCACGGTGGTYTCCATGCA ACGTGCAG
F ₂₁₅₀	CCTAGTAGTCAGTTATGTCAAC
R ₂₃₀₀	TCTATAAGCTGGAGGAGTGCAG
F _{polM}	CCAAATATTTACCATTTGGATAAGGGTATTTAACCTTATTAT CCAGAACATCTAG
R ₁₆₅₄	CTAGATGTTCTGGATAATAAGGTTAAATACCCTTATCCAAT GGTAAATATTTGG

注:其中 F 代表 Forward primer,即上游引物,R 代表 Reverse primer,即下游引物

1.2 克隆策略

基于本实验室所建立的不依赖酶切和连接的分子克隆(restriction digestion and ligation-independent cloning,RLIC)方法^[11]。设计 1 对突变引物,该引物含有突变目标碱基片段,其 2 侧末端序列与载体相应区域同源,利用末端与载体相应部位退火并延伸,最终得到含有突变目标碱基的双链环状缺刻分子,缺刻分子在转化后修补为完整质粒。利用这一克隆策略,构建 pLenti-P、聚合酶表达缺失的 HBV1.1 倍体克隆。用引物 F_{pol} 及 R_{pol} 从 pcDNA3.1-pol 扩增 HBV pol 片段,该片段 2 端分别带有 pCMV 3' 末端及部分 V5 epitope 序列。用 QIAGEN 胶回收试剂盒回收该片段,取 1 μg 回收片段,pCH9/3091,0.5 μl PrimeSTAR 聚合酶等建立 50 μl 反应体系。按如下条件扩增:94 ℃预变性 3 min,94 ℃ 15 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 1 min 30 s,35 个循环,72 ℃延伸 3 min。扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化,取 1/3 纯化产物用 Dpn I 37 ℃消化 4 h,然后取消化产物 2 μl 电转化 JM 109 感受态细胞,获得的克隆

做 PCR 及测序鉴定。

1.3 细胞株与转染

所用细胞系为 HepG2 细胞和 HEK-293 细胞,所用培养基分别为 MEM 加 10%FBS 及 DMEM 加 10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)。以上细胞均于 37 ℃,5%CO₂ 的孵箱中培养。6 孔板铺板 16 h 换新鲜培养基并转染,具体操作按产品说明书进行。

1.4 提取 HBV 复制中间体

转染后第 6 天收集细胞,按下述方法提取 HBV 复制中间体。用 PBS 洗涤细胞后,每孔加入 500 μl 细胞裂解液(10 mol/L Tris HCl pH 8.0,1 mmol/L EDTA,1%NP 40,2%蔗糖),37 ℃孵箱孵育 15 min;15 × 10³ g 离心 5 min,转移上清至洁净 EP 管中;分别加入 MgCl₂ 至终浓度为 10 mmol/L,DNase I (Promega)至 40 U/ml,RNase A(Promega)至 1 mg/ml,37 ℃孵育 4 h;反应完成后加入 200 μl 含 1.5 mol/L NaCl 的 35% PEG 8 000,冰浴 40 min 后,11 × 10³ g 于 4 ℃离心 5 min,弃上清;向沉淀中加入蛋白酶 K 消化缓冲液(0.5% SDS,2.5 mmol/L Tris HCl pH 8.0,10 mmol/L EDTA,150 mmol/L NaCl)至总体积为 500 μl,再加入蛋白酶 K 至终浓度为 0.6 mg/ml,45 ℃孵育过夜;酚氯仿抽提;乙醇沉淀;产物溶于 10 μl 灭菌超纯水中。

1.5 Southern blot 及 real-time PCR

取 HBV DNA 2 μl 为模板,F₂₁₅₀、R₂₃₀₀ 分别为上下游引物,进行定量。剩余 8 μl HBV DNA 经 0.9% 琼脂糖凝胶电泳后,转印至带正电荷尼龙膜(Roche 公司),120 ℃干烤固定 30 min 后预杂交、杂交(地高辛标记的 HBV DNA 探针)、洗涤游离探针后用自显影技术进行检测,具体操作按产品说明书进行。

1.6 统计学处理

数据采用 GraphPad Prism 6 软件处理。real-time PCR 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,为计量资料,采用单因素方差分析及 Tukey test。检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HBV1.1P-pLenti-P 克隆及鉴定

为了使 HBV P 表达缺失,首先以 pcDNA3.1-pol 为模板,用带有点突变的上游引物 F_{polM} 和 R₁₆₅₄ 扩增不表达 P 区的 HBV 片段(图 1A1),然后,以胶回收纯化后的该片段为大引物,pCH9/3091 为模板进行线性扩增,得到 P 基因表达缺失的表达产物,经 Dpn I 酶切后,模板质粒 pCH9/3091 被去除,保留线性扩增产物,这些带缺口的产物在转化大肠杆菌后被修复,得到候选克隆(图 1A2),能表达除 P 之外的所有 HBV 产物(图 1B1、图 1B2)。核酸电泳初步鉴定大小正确(图 1C)。小量抽提质粒后送至华大基因公司测序,测序结果与 NCBI 序列进行比对,显示构建的质粒序列正确。

pLenti-P 构建方法与 HBV1.1P-构建方法原理相同。本

实验室保存有 HBV A、B、C、D 型质粒。用引物 F_{pol} 、 R_{pol} 分别从 HBV A、B、C、D 型质粒上扩增 HBV 各基因型 HBV P 片段,PCR 鉴定结果如图(图 1D)所示。然后以扩增产物为引物,pCH9/3091 为模板扩增各型 pLenti-P 基因。小量抽提质粒后送至华大基因公司测序,测序鉴定正确后转化获得大量各型 pLenti-P 质粒。

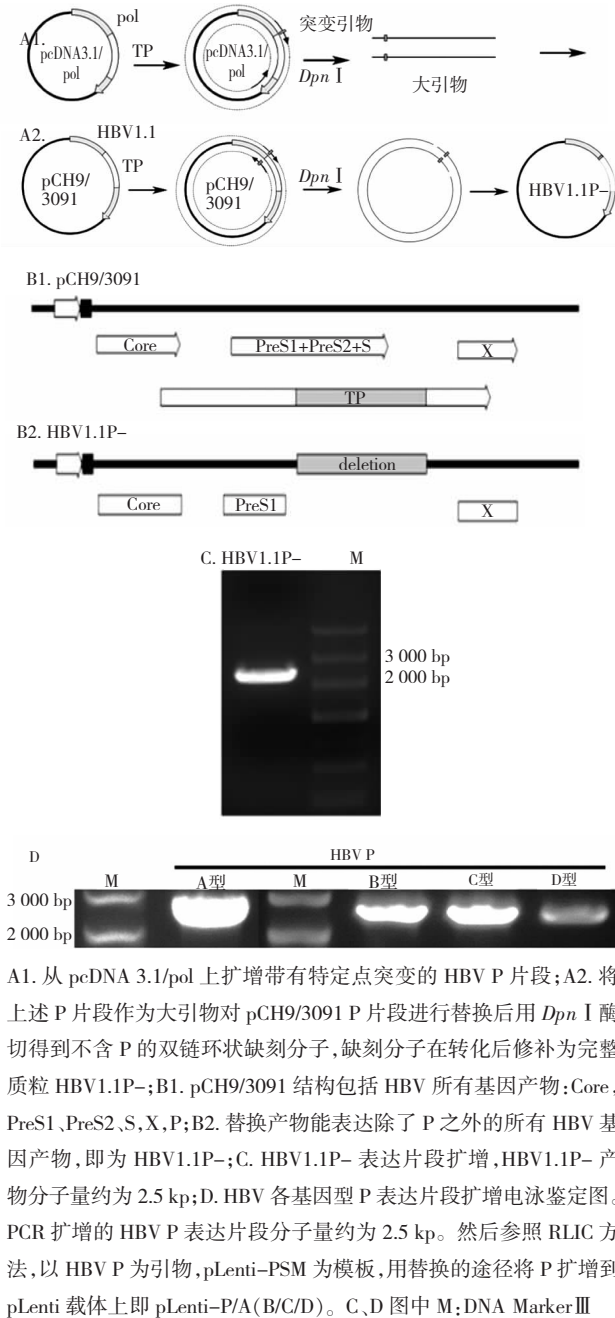
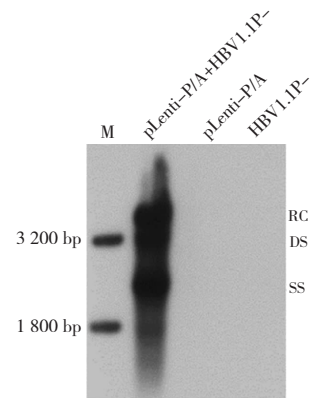


图 1 克隆策略及 HBV1.1P-、HBV 各基因型 P 质粒构建
Fig.1 Cloning strategy and P plasmid construction of HBV1.1P- and each genotype of HBV

2.2 pLenti-P 和 HBV1.1P-共表达后能支持 HBV 复制

除了测序以外,为了验证 pLenti-P 和 HBV1.1P-是否具有正常功能,将二者共转染 HepG2 细胞,提取 HBV 复制中

间, Southern blot 检测 HBV 复制(图 2)。单独转染质粒 pLenti-P 或者 HBV1.1P-的细胞中,未能检测到 HBV 复制中间体,二者共转染的细胞中,检测到了较强的 HBV 复制中间体信号。以上结果提示 pLenti-P 或 HBV1.1P-单独表达均不能支持 HBV 复制,但 pLenti-P 与 HBV1.1P-可通过共表达从而构成互补以支持 HBV 复制,证明 pLenti-P 和 HBV1.1P-构建成功,pLenti-P 和 HBV1.1P-共表达后能够重新获得 HBV 复制能力。



分别将 HBV1.1P-、pLenti-P/A 单独或二者共转染 HEK 293 细胞,转染后第 5 天提取细胞内 HBV 复制中间体,并用 Southern blot 检测。其中 HBV1.1P- 或 pLenti-P/A 均不能支持 HBV 复制,二者共表达后能够恢复 HBV 复制能力,HBV1.1P-、pLenti-P/A 质粒功能完整,HBV P。M:DNA maker;RC:松弛环状 DNA;DS:双链线性 DNA;SS:单链 DNA

图 2 HBV P 与 HBV1.1P- 互补实验

Fig.2 Complementary experiment of HBV P and HBV1.1P-

2.3 各基因型聚合酶复制 HBV DNA 能力不同

上述结果显示,pLenti-P 和 HBV1.1P-表达片段构建正确,且二者共表达后可支持 HBV 复制,而单独转染 pLenti-P 或 HBV1.1P-均不能支持 HBV 复制。为了比较不同基因型聚合酶复制 HBV DNA 的能力差异,将构建成功的 HBV 各基因型的聚合酶表达质粒分别与同一种 P 缺失的 HBV 表达质粒共转染 HEK-293 细胞以检测 HBV 复制中间体水平。种板 16 h 后共转染 HBV1.1P-和各型 pLenti-P 及绿色荧光蛋白,转染后 72 h 观察荧光。荧光结果示各孔细胞转染效率相当,无明显差异(图 3A)。转染后第 6 天收集细胞,提取 HBV 复制中间体,用 real-time PCR 和 Southern blot 进行检测。Southern blot 检测结果如图 3B,结果显示各型 P 基因与 P-基因共转染后,可以使 HBV 重新获得表达,但是各型聚合酶复制 HBV 的水平并不一致, $F_{(4,10)}=91.88, P=0.000$ 。其中 A、D 型比 B、C 型复制水平显著增高, $P_{(A,B)}=0.001, P_{(A,C)}=0.001, P_{(B,D)}=0.001, P_{(C,D)}=0.001$;A 和 D 型复制水平无统计学差异 $P_{(A,D)}=0.151$;B 和 C 型复制水平无统计学差异 $P_{(B,C)}=0.061$ 。Real-time PCR 结果如图 3C,与 Southern blot 检测结果基本一致。这就提示不同基因型聚合酶复制 HBV DNA 的水平并不完全一致,存在一定差异。

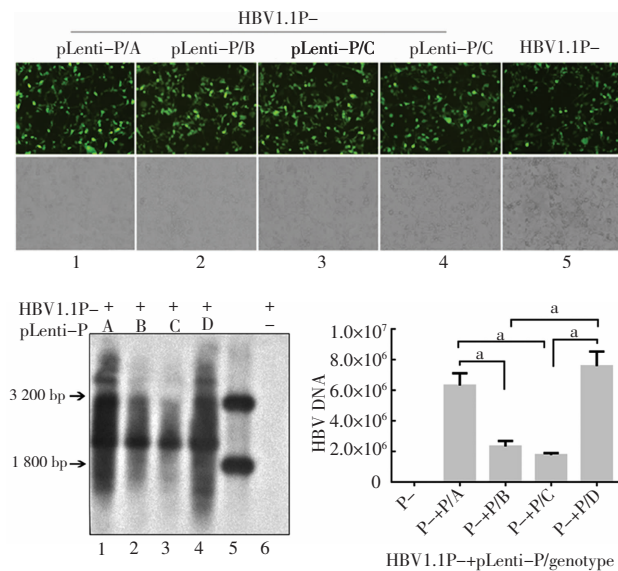


图3 共表达 HBV1.1P- 和 pLenti-P 及检测

Fig.3 Co-expression and detection of HBV1.1P- and pLenti-P

分别将 A、B、C、D 型 pLenti-P 与 HBV1.1P- 共转染 HEK 293 细胞 (转染效率如图 A) 5 d 后提取细胞内 HBV 复制中间体, 并用 Southern blot (图 B) 及 real-time PCR (图 C) 检测 HBV DNA 的量, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示。其中, a 为 $P < 0.001$, HBV A 和 D 型复制水平无统计学差异 ($P=0.151$), B 型和 C 型复制水平无统计学差异 ($P=0.061$), A 型和 D 型 HBV 复制水平高于 B 型和 C 型, 有统计学意义 ($P_{AB}=0.001$, $P_{BD}=0.001$, $P_{CD}=0.001$)。B 图中第 5 泳带: DNA Marker

3 讨论

HBV 基因型和亚型与临床及病毒学特征相关 [3-4, 7, 12], 提示 HBV 基因型可能在病毒-宿主相互作用中有着重要作用。根据全基因组核苷酸序列异源性 $\geq 8\%$ 或者 HBV S 基因区核苷酸序列异源性 $\geq 4\%$ 的原则 [9, 13-14], 将 HBV 分为 10 个基因型, 即 A~J [15-18]。目前, 研究最为广泛的是基因型 A、B、C 和 D。HBV 不同基因型地理分布有显著差异 [19]。其中, A 型主要见于北欧, B 型和 C 型见于东亚和远东, D 型见于世界各地, 但以地中海区域、近东、中东、南亚为主 [20-22]。我国存在 A、B、C、D 4 种基因型, 以 B 型和 C 型为主, 很小比例的 B/C 混合型, 也有 D 型和 A 型 [23]。

HBV 基因型不仅影响 HBV 相关肝脏疾病自然史 [6], 还影响 HBV 治疗反应性 [5, 12]。此外, HBV 基因型也与前 C 区/BCP 区突变紧密联系 [8, 24-25]。临床研究证实, 与基因型 B 和 C 相比, 基因型 A 和 D 的感染者更有可能从急性乙肝感染迁延为慢性乙肝感

染 [26]。基因型 A 和 B 发生自发性 HBeAg 血清转归的几率更高 [3, 8, 27-28]。与基因型 A 和 B 相比, 基因型 C 和 D 的慢性感染更有可能进展为肝细胞肝癌 (HCC) [2, 4, 27]。这些现象均提示 HBV 基因型之间存在致病能力差异。此外, A 型和 B 型比 C 型和 D 型对干扰素治疗的反应性更好 [7]。因此, 对于 HBV 基因型的深入了解能够帮助临床医生按照基因型不同来区分病人, 以预测病程进展风险并帮助选择合适的抗病毒治疗策略。

本文研究结果显示聚合酶基因和聚合酶缺失的 HBV 基因组共表达后可支持 HBV 复制, 而单独转染聚合酶基因或聚合酶缺失的 HBV 基因组均不能支持 HBV 复制。HBV 不同基因型聚合酶之间复制 HBV 能力存在差异。过去基因型区分主要依靠全长核苷酸序列或 S 基因序列进行 [14]。研究证实通过 P 区测序对 HBV 进行分型与传统分型方法分型结果一致 [23]。那么, HBV 不同基因型聚合酶之间复制 HBV 能力存在差异, 也就提示了 HBV 不同基因型之间 HBV DNA 水平存在差异, 这与文献报道一致 [7, 12]。同时, 证实了在基因型影响病毒复制的过程中, 聚合酶发挥了重要作用。这样, 就可通过 P 区测序来区分不同基因型, 进而对其病程进展的风险度进行评估, 并帮助临床医生选择合适的抗病毒药物治疗方案。

A、D 型比 B、C 型复制水平明显增高; A 型和 D 型复制水平无明显差异; B 型和 C 型复制水平无显著差异。HBV 感染的自然史一般可以分为 3 个期, 即免疫耐受期, 免疫清除期和非活动或低 (非) 复制期。A、D 型地理分布广泛, 可能与 A、D 型 HBV 复制水平高, 感染后不易完全清除或清除后容易发生再燃有关; B、C 型分布集中, 可能与 B、C 型 HBV 复制水平低, 小剂量持续刺激机体免疫系统感染后引起免疫耐受或免疫麻痹, 使得 B、C 型感染者最终成为病毒携带者, 即传染源, 并造成一定范围内的传播, 这样就使得 B、C 型感染相对较集中。

混合基因型 HBV DNA 水平高于单独一种基因型 [12]。以 B、C 型为优势基因型的东亚地区乙肝病毒携带者较西方国家多, 可能与其 HBV 呈较低水平复制有关。为了抵抗免疫压力, 基因型发生转换并形成混合基因型。关于在国内发现的基因混合型多为 B/C 混合型, 可能与 B、C 型复制水平均较低以及检测下限有关。由于 B、C 型复制水平较低, 在同等条件下检测时检测下限需降低, 当降低到一定程度时,

会出现混合基因型。其他的基因混合型可能也存在,只是受目前检测条件所限,还未检测出。

总之,本文关于不同基因型聚合酶复制 HBV DNA 能力差异的研究为深入研究不同基因型在地理分布、所致疾病严重性等方面提供了有用的信息并奠定了坚实的基础。按照 P 区序列进行基因型分型对 HBV 感染加以区分,能够帮助临床医生区分恶性进展高风险患者以及选择合适的抗病毒治疗方案。

参 考 文 献

- [1] Liang T J. Hepatitis B: the virus and disease[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5 Suppl): S13-S21.
- [2] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(4): 1207-1209.
- [3] Chu CJ, Hussain M, and Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(7): 1756-1762.
- [4] Chu CM, Liaw YF. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(3): 411-417.
- [5] Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(2): 335-352.
- [6] Chan HL, Tsang SW, Liew CT, et al. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection[J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(2): 406-412.
- [7] Gu XB, Yang XJ, Wang JH, et al. Relationship between HBV genotypes B, C and follicular helper T cells in patients with chronic hepatitis B and its significance[J]. *Hepat Mon*, 2013, 13(1): e6221.
- [8] Liu CJ, Kao JH. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes a to j[J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33(2): 97-102.
- [9] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes[J]. *J Gen Virol*, 1988, 69(Pt 10): 2575-2583.
- [10] Guirgis BS, Abbas RO, Azzazy HM. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications [J]. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(11): 941-953.
- [11] 黄媛,陶颖,张文露,等.一种新的 DNA 分子克隆方法[J]. *中国科学-生命科学*, 2011, 41(9): 722-729.
- [12] Toan NL, Song le H, Kremsner PG, et al. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam[J]. *Hepatology*, 2006, 43(6): 1375-1384.
- [13] Norder H, Hammas B, Löfdahl S, et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains[J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(Pt 5): 1201-1208.
- [14] Ohba K, Mizokami M, Ohno T, et al. Relationships between serotypes and genotypes of hepatitis B virus: genetic classification of HBV by use of surface genes[J]. *Virus Res*, 1995, 39(1): 25-34.
- [15] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 1): 67-74.
- [16] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 8): 2059-2073.
- [17] Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam[J]. *J Virol*, 2008, 82(11): 5657-5663.
- [18] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J[J]. *J Virol*, 2009, 83(20): 10538-10547.
- [19] Dupinay T, Restorp K, Leutscher P, et al. High prevalence of hepatitis B virus genotype E in Northern Madagascar indicates a West-African lineage[J]. *J Med Virol*, 2010, 82(9): 1515-1526.
- [20] Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus [J]. *Hepatol Res*, 2010, 40(1): 14-30.
- [21] Andernach IE, Nolte C, Pape JW, et al. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(8): 1222-1228.
- [22] Andernach IE, Hubschen JM, Muller CP. Hepatitis B virus: the genotype E puzzle[J]. *Rev Med Virol*, 2009, 19(4): 231-240.
- [23] Ma Y, Ding Y, Juan F, et al. Genotyping the hepatitis B virus with a fragment of the HBV DNA polymerase gene in Shenyang, China[J]. *Virol J*, 2011, 8: 315.
- [24] Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C[J]. *Hepatology*, 2001, 33(1): 218-223.
- [25] Sharma S, Sharma B, Singla B, et al. Clinical significance of genotypes and precore/basal core promoter mutations in HBV related chronic liver disease patients in North India[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(3): 794-802.
- [26] Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? [J]. *J Viral Hepat*, 1999, 6(4): 299-304.
- [27] Livingston SE, Simonetti JP, Bulkow LR, et al. Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(5): 1452-1457.
- [28] Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients[J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(6): 1848-1856.

(责任编辑:关蕴良)