

论 著

一种检测乙型肝炎病毒核心启动子区nt1758-1777缺失突变新方法的建立

粘学渊, 许智慧, 刘妍, 李晓东, 陈建宏, 秦雅群, 廖昊, 徐东平

[摘要] 目的 建立一种新的单管巢式实时荧光PCR熔解曲线法用于快速灵敏地筛检临床乙型肝炎病毒(HBV)样本核心启动子区nt1758-1777片段缺失突变。**方法** 通过比对分析GenBank收录的HBV基因序列, 设计通用巢式PCR引物, 建立优化方法体系; 对340例慢性乙型肝炎患者血清HBV CP区进行扩增, 产物直接测序, 并随机选择50例样本进行克隆测序, 分析nt1758-1777缺失突变检出率。野生型和缺失型标准质粒来自于单克隆测序样本, 并对两种标准质粒及克隆检测样本进行荧光定量PCR扩增, 获得熔解曲线及熔解温度, 得到熔解曲线的阳性标准。用新建的方法对340份样本进行检测, 并用焦磷酸测序加以验证。**结果** 直接测序法检出16例(4.7%)阳性样本。标准质粒及克隆检测样本中缺失序列比例 $\geq 15\%$ 的样品, 其熔解温度(T_m) $\geq 88.3^\circ\text{C}$, 遂将 $\geq 88.3^\circ\text{C}$ 作为新方法的阳性标准。用新方法检出47例(13.8%)阳性样本, 其中用焦磷酸测序验证缺失突变比例 $\geq 1.0\%$ 的样本38例, $<1.0\%$ 的样本9例; 15份阴性样本缺失突变比例均 $<1.0\%$ 。用焦磷酸测序验证缺失突变比例 1.0% 作为阳性阈值, 新方法对nt1758-1777缺失检测的阳性符合率为80.9%, 阴性符合率为100%, 两种方法的一致性Kappa值为0.671。**结论** 与直接测序法相比, 新方法可显著提高nt1758-1777缺失检出率, 结合焦磷酸测序证实, 可有效提高检测的准确性和经济性。该方法对建立HBV其他缺失突变的检测方法也可提供借鉴。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 核心启动子; 基因缺失; 熔解曲线; 焦磷酸测序

[中图分类号] R512.62

[文献标志码] A

[文章编号] 0577-7402(2016)03-0189-06

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2016.03.04

A novel assay for detecting the mutation of nucleotide 1758-1777 deletion in core promoter region of hepatitis B virus

NIAN Xue-yuan¹, XU Zhi-hui², LIU Yan², LI Xiao-dong², CHEN Jian-hong¹, QIN Ya-qun², LIAO Hao², XU Dong-ping^{1*}

¹Institute of Infectious Diseases/Research Center for Clinical and Translational Medicine, 302 Teaching Hospital of Peking University, Beijing 100039, China

²Institute of Infectious Diseases/Research Center for Clinical and Translational Medicine, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

*Corresponding author, E-mail: xudongping302@sina.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81373136, 81271847)

[Abstract] **Objective** Nucleotide (nt) 1758-1777 deletion in core promoter (CP) region of hepatitis B virus (HBV) has been suggested to be associated with disease progression. However, the complicated and less sensitive assay for it limited its use in clinic. The present study was aimed at setting a novel assay for its detection using single-tube nested PCR amplification and real-time PCR melting curve analysis. **Methods** The PCR primers were designed through analysis of HBV genomic sequences in GenBank, and detection conditions were optimized. HBV CP region from 340 serum samples of chronic hepatitis B patients were amplified and directly sequenced, and fifty samples were randomly selected for cloning and sequencing for analysis of nt 1758-1777 deletion. The wild-type and deletion-type plasmids were extracted from mono-cloning samples. Positive standard of melting curve analysis was set up in light of the results of PCR amplification of two standard plasmids and cloning samples. The new method of assay was used in 340 samples, and the data were verified by the results of pyrosequencing. **Results** Sixteen (4.7%) samples were positive for the deletion by direct sequencing, and no less than 15% samples in standard plasmids and cloning sequencing showed sequence deletion. The melting temperature (T_m) of deletion-type plasmid and cloning samples containing $\geq 15\%$ proportion of the deletion

[基金项目] 国家自然科学基金(81373136, 81271847)

[作者简介] 粘学渊, 医学硕士。主要从事肝病的基础与临床研究

[作者单位] 100039 北京 北京大学解放军302医院教学医院临床研究管理中心(粘学渊、陈建宏、徐东平); 100039 北京 解放军302医院临床研究管理中心(许智慧、刘妍、李晓东、秦雅群、廖昊、徐东平)

[通讯作者] 徐东平, E-mail: xudongping302@sina.com

sequence was $\geq 88.3^{\circ}\text{C}$, which was determined as positive standard of the novel assay. Forty-seven (13.8%) samples were detected positive for nt 1758-1777 deletion by the novel assay. Among them, deletion ratio was $\geq 1.0\%$ in 38 samples and $<1.0\%$ in 9 samples by pyrosequencing, respectively. The deletion ratio was all $<1.0\%$ in 15 negative control samples. The deletion ratio of 1.0% was taken as positive cutoff by pyrosequencing, the novel assay had 80.9% positive consistency and 100% negative consistency, with a Kappa value of 0.671. **Conclusions** Comparing with direct sequencing, the novel assay significantly increased detection rate of nt 1758-1777 deletion. In combination with pyrosequencing for confirmation, the accuracy and cost-effectiveness of the detection could be significantly improved. The novel assay offers an example for detecting HBV genetic deletions.

[Key words] hepatitis B virus; core promoter; gene deletion; melting curve; pyrosequencing

乙型肝炎慢性化与重症化的发生机制十分复杂,其中乙型肝炎病毒(HBV)基因突变导致的病毒生物学特性改变可能是重要因素之一^[1-3]。HBV核心启动子(core promoter, CP)区是病毒的关键序列,可调控HBV前基因RNA(pgRNA)和PreC/C mRNA的表达。此外,HBV CP区与HBV X基因读码框3'端重叠,所以CP区突变还可能引起X基因编码序列的改变。以往对CP区突变的研究主要集中在T1753V、A1762T/G1764A等位点^[4],本课题组前期研究也发现这些位点的突变与慢加急性肝衰竭的发生密切相关^[5-6],对CP区的缺失突变研究报道较少。Chen等^[7]发现了CP区nt1758-1777片段缺失突变,并报道该缺失能增强HBV病毒的复制力。CP区的缺失会产生截短型的X蛋白多肽,可能导致疾病加重,与肝癌的发生发展密切相关^[8-9]。Guo等^[10]建立稳定表达HBx基因截短型蛋白(nt1758-1776)的L02肝细胞株,发现HBx截短型蛋白可能通过增加肝星状细胞增殖潜能以及上调纤维化相关分子途径而促进肝细胞纤维化^[10]。据此我们推测HBV CP区发生的nt1758-1777突变可能与疾病的进展相关。

以往对HBV短片段缺失的检测主要采用直接测序法,但该法只有在突变序列 $>20\%$ 才能检出^[11],且由于短片段缺失可造成缺失与共存的野生序列峰图交错,进一步降低了检测灵敏度。本研究旨在建立一种灵敏、经济、便捷的检测方法,用于nt1758-1777缺失突变的筛查,以明确 nt1758-1777缺失突变的临床意义。同时,该方法的建立也可对HBV其他缺失突变的检测提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 检测样本 样本来源于2005年1月—2008年12

月在解放军302医院就诊的340例慢性乙型肝炎患者,血清HBV DNA载量 $>10^3\text{U/ml}$,HBV基因型为B或C型,患者平均年龄31.5(13~82)岁,男295例,女45例。慢性乙型肝炎诊断符合2000年9月(西安)全国会议修订的《病毒性肝炎防治方案》标准^[12]。

1.2 主要试剂及仪器 HBV DNA定量试剂盒(上海复星公司),DNA定量分析仪(ABI公司),血清DNA提取试剂(北京天恩泽基因工程有限公司);PCR试剂(北京全式金生物技术有限公司),普通PCR仪(ABI公司);实时荧光定量试剂盒(上海复星公司),荧光定量PCR反应仪(上海宏石公司);焦磷酸测序试剂(QIAGEN公司),PyroMark ID焦磷酸测序仪(QIAGEN公司);胶回收试剂盒(上海生物公司),质粒提取试剂盒(QIAGEN公司);PGEM-Teasy载体、JM109感受态细胞(Promega公司)。

1.3 引物设计与合成 从GenBank下载HBV基因组全序列(AHB: GQ377514-GQ377644; CHB: FJ562218-FJ562340; ACLF: FJ386574-FJ386619)^[13]。应用Vector NTI Suite 8.0软件对其基因多态性进行分析,重点比对我国常见的B型和C型序列,并应用Mac Vector 6.5.3软件对巢式PCR引物的参数进行分析。通过反复实验,筛选出既有较好序列兼容性又有较高反应效率的外引物和内引物。引物合成由北京天一辉远生物公司完成,焦磷酸测序引物由上海欧易生物科技有限公司合成(表1)。

1.4 血清HBV DNA的提取及CP区PCR扩增 采用DNA Out试剂盒提取血清HBV DNA,严格按照说明书进行操作。CP区扩增采用单管半巢式PCR方法,第一轮总体积为 $25\mu\text{l}$,各组分为: $2 \times \text{Mix Buffer}$ $12.5\mu\text{l}$, $1/10$ 稀释 CupX $0.25\mu\text{l}$, $1/10$ 稀释 Xdown2 $0.25\mu\text{l}$, HBV DNA $11.5\mu\text{l}$ 。反应条件: 94°C 3min;

表1 引物信息

Tab.1 Information of primers

Primer	Sequence(5'—3')	Site(nt)	Use
CupX	GTGTGCACTTCGCTTCACCT	1577-1596	Upstream primer for nested and real-time PCR
Xdown2	CGAATAGAAGGAAAGAAGTCAG	1962-1983	Downstream primer for first round nested PCR
Xdown4	CTTTATACGGGTCAATGTCCATG	1900-1922	Downstream primer for second round nested PCR
CdownX	GAGATGATTAGGCAGAGGTG	1826-1845	Downstream primer for real-time PCR
F1	CGACCTTGAGGCATACTCAAA	1691-1712	Upstream primer for pyrosequencing
R1	AACAGACCAATTATGCCTACAGC	1780-1803	Downstream primer for pyrosequencing

94℃ 20s、59℃ 20s、72℃ 40s, 2个循环; 94℃ 20s、57℃ 20s、72℃ 40s, 2个循环; 94℃ 20s、55℃ 20s、72℃ 40s, 2个循环; 94℃ 20s、53℃ 20s、72℃ 40s, 2个循环; 94℃ 20s、51℃ 20s、72℃ 40s, 2个循环; 94℃ 20s、54℃ 20s、72℃ 40s, 30个循环; 72℃ 10min。第二轮总体积为50μl, 各组分为: 2 × Mix Buffer 15μl, CupX 0.5μl, Xdown4 0.5μl, ddH₂O补足至25μl, 不换管直接加到第一轮PCR管中。反应条件: 94℃ 3min; 94℃ 15s、53℃ 15s、72℃ 30s, 30个循环; 72℃ 10min。

1.5 直接测序 单管巢式PCR扩增产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定, 阳性样本经回收纯化DNA后进行直接测序, 测序由北京天一辉远生物公司完成。

1.6 HBV CP区TA基因克隆及标准样品制备 从340例慢性乙型肝炎患者血清样本中随机选择50例进行单管巢式PCR扩增, 扩增后的产物克隆至pGEM-Teasy载体, 转化JM109感受态细胞, 每份样本挑选至少30个克隆, 经PCR鉴定阳性的样品送测序, 分析CP区nt1758-1777是否缺失及其缺失序列在克隆序列中所占的比例, 具体步骤参考相关文献^[14]。

1.7 标准质粒制备 选取克隆测序鉴定的野生型和缺失型单克隆样本, 摇菌16h后提取质粒, 分别以野生型和缺失型标准质粒作为对照, 同时设立空白对照。

1.8 荧光定量PCR熔解曲线检测方法的建立及应用 荧光定量PCR反应总体积30μl, 各组分为: 10 × Buffer 3μl, 10 × MgCl₂ 3μl, 5 × dNTP 6μl, CupX 0.3μl, CdownX 0.3μl, Taq DNA 0.5μl, 荧光染料0.15μl, ddH₂O补足到30μl, 加入1μl标准质粒作为模板。反应条件: 94℃ 3min; 94℃ 15s、60℃ 40s(荧光采集), 40个循环, 以每1℃采一次荧光的

变温速度将反应体系温度从75℃升至94℃, 构建缺失型和野生型标准质粒熔解曲线及获得解链温度(T_m)。50例克隆样品扩增同上。根据标准质粒及克隆样品结果, 得到熔解曲线的阳性标准, 进而建立熔解曲线法, 并对340份慢性乙型肝炎患者血清样本进行检测。

1.9 焦磷酸测序 对通过熔解曲线法获得的阳性样本和随机选择的阴性样本进行深度测序, 由上海欧易生物科技有限公司完成。

1.10 统计学处理 实验数据采用SPSS 16.0软件进行统计分析, 阳性符合率为焦磷酸测序阳性率与熔解曲线法阳性率比值, 阴性符合率为焦磷酸测序阴性率与熔解曲线法阴性率比值, 灵敏度和特异性通过四格表求得, 熔解曲线法与焦磷酸测序法一致性采用Kappa检验(0.6~0.8为高度一致)。

2 结果

2.1 HBV CP区单管巢式PCR扩增及产物直接测序结果 340例样本通过设计的内外两对通用型引物, 采用单管巢式PCR扩增HBV CP区, 得到长度为346bp的DNA片段。对琼脂糖凝胶电泳鉴定为阳性的产物, 回收纯化DNA直接测序。结果16例患者样本检出缺失阳性, 缺失发生率为4.7%(图1)。

2.2 HBV CP区TA基因克隆 在340例样本中随机选择50例进行T-A克隆, 结果在6例样品中发现HBV CP区nt1758-1777缺失序列比例≥15%, 并且这6例样本直接测序结果为阳性2例、阴性4例(表2)。

2.3 荧光定量PCR熔解曲线检测方法的建立及应用 标准质粒经荧光定量PCR扩增, 获得标准质粒的熔解曲线及T_m(图2A)。克隆样品经荧光定量PCR扩增, 获得克隆样本的熔解曲线及T_m, 其中缺失

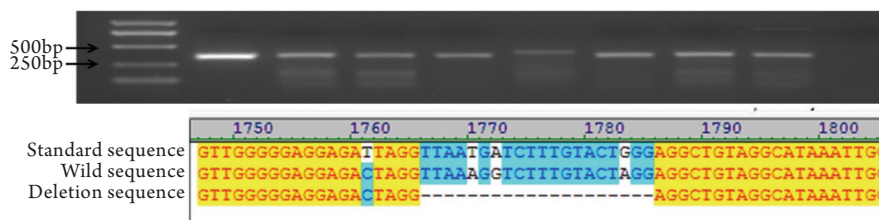


图1 单管巢式PCR扩增琼脂糖凝胶电泳结果及直接测序结果

Fig.1 The result of single-tube nested PCR amplification and direct sequencing

表2 6例缺失序列比例≥15%的样本

Tab.2 The deletion sequence ratio of 6 samples no less than 15%

Sample	Number of wild sequence	Number of deletion sequence	Deletion sequence ratio (%)	Direct sequencing
20	44	8	15.38	Negative
213	34	6	15.00	Negative
2474	37	8	17.78	Negative
7090	35	9	20.45	Negative
12193	20	21	51.22	Positive
13390	14	18	62.50	Positive

序列比例 $\geq 15\%$ 的样本 $T_m \geq 88.3^\circ\text{C}$ (图2B)。本研究设定熔解曲线法阳性标准为 $T_m \geq 88.3^\circ\text{C}$ 。应用建立的熔解曲线法对纳入的340例样本进行检测,得到阳性样本47例,阴性样本293例,阳性检出率为13.8%。

2.4 荧光定量PCR熔解曲线检测方法经焦磷酸测序鉴定结果 对熔解曲线法获得的47份阳性样本和随机选择的15份阴性样本进行焦磷酸测序验证。47例阳性样本中检出38例缺失序列比例 $\geq 1.0\%$, 9例缺失序列比例 $< 1.0\%$ 样本;熔解曲线法与焦磷酸测序法相比,将焦磷酸测序检测缺失突变比例的阳性阈值定为1%时,阳性符合率为80.9%(38/47),阴性符合率为100%(15/15,表3)。

2.5 熔解曲线法初筛经焦磷酸测序验证与直接测序法比较 在340例慢性乙型肝炎样本中,直接测序法得到阳性样本16例,占4.7%;熔解曲线法初筛阳性后,再经焦磷酸测序验证的阳性样本38例,占11.2%;直接测序法阳性的样本经熔解曲线法初筛

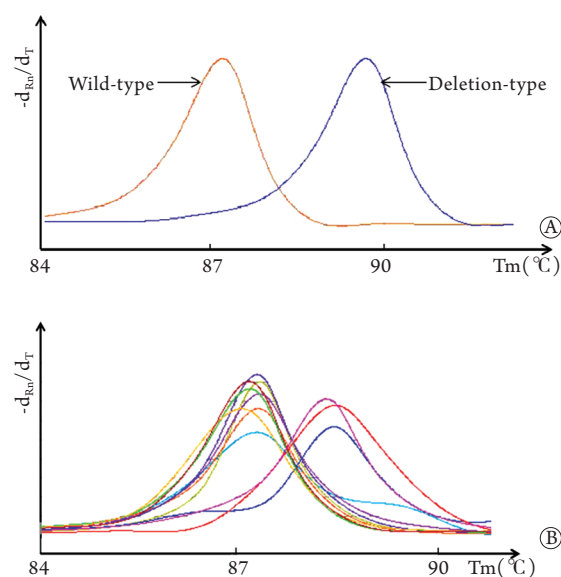


图2 建立单管巢式PCR熔解曲线

Fig.2 Building the single-tube nested PCR combining with melting curve method

A. Standardized plasmid; B. Clonal sample

表3 熔解曲线法获得结果经焦磷酸测序验证

Tab.3 The result of melting curve method validated by pyrosequencing

Positive cutoff by pyrosequencing	True positive	False positive	True negative	False negative	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive consistency (%)	Negative consistency (%)	Kappa value
$\geq 0.1\%$	42	5	10	5	89.4	66.7	89.4	66.7	0.644
$\geq 0.5\%$	40	7	13	2	95.2	65.0	85.1	86.7	0.645
$\geq 1.0\%$	38	9	15	0	100.0	62.5	80.9	100.0	0.671
$\geq 5.0\%$	32	15	15	0	100.0	50.0	68.1	100.0	0.533

和焦磷酸测序验证均为阳性,有22例缺失突变样本用直接测序法未能检出,占总缺失突变样本数的57.9%。

3 讨论

以往对HBV短片段缺失的检测主要采用直接测序法,但该方法只有在突变序列 $> 20\%$ 才能检出^[11],且由于短片段缺失可造成缺失与共存的野生序列峰图交错,进一步降低了检测灵敏度。克隆测序是检测缺失突变的金标准,但操作烦琐,代价较高。焦磷酸测序作为一种新的基因检测技术,具有较高的分辨率,目前已应用于HBV耐药突变的检测^[15-16]以及对HBV全基因组序列变异的分析^[17],但对于发生率较低的突变样本进行较大量检测时成本仍然较高,有必要先用一种经济简便的筛选方法锚定可能阳性的样本。

目前,高分辨率熔解曲线已用于单碱基多态性^[18-19]和HBV基因型检测^[20-21]。国内有研究者应用高分辨率熔解曲线对HBV CP区变异进行检测^[22]。本研究熔解曲线检测的原理是:PCR完成后,反应体系温度从 75°C 升至 94°C ,在低温时,绿如蓝核酸染料与

PCR管中所有的产物模板进行结合,此时信号量达到最大;当温度缓慢升高时,由于缺失和野生序列在序列、长度和GC含量方面的不同造成结合能力上的差异,在此过程中以每 1°C 采一次荧光的变温速度连续进行荧光信号监控,最终得到不同比例缺失和野生序列的熔解曲线图及 T_m 。缺失型质粒及克隆样品(nt1758-1777缺失序列比例 $\geq 15\%$)经荧光定量PCR扩增得到 $T_m \geq 88.3^\circ\text{C}$ 。最终根据以上结果设定熔解曲线法的阳性标准为 $T_m \geq 88.3^\circ\text{C}$ 。

本研究经焦磷酸验证发现熔解曲线法检测HBV CP区nt1758-1777缺失的阳性符合率为80.9%(38/47),阴性符合率为100%(15/15),灵敏度为100%(38/38),特异度为62.5%(15/24),二者高度一致(Kappa=0.671,表3)。本研究中阴性符合率为100%,可以确定筛选的阳性样本中包含了所有的真阳性样本。本研究中阳性符合率为80.9%,有19.1%的阳性样品实际为假阳性,其原因可能在于CP存在其他位置上的缺失,导致新产生的缺失与野生区的序列、长度和GC含量不同而造成结合能力的差异,熔解曲线法同样得到 $T_m \geq 88.3^\circ\text{C}$ 的假阳性样品。但本研究建立单管巢式PCR熔解曲线法只

是对含有缺失序列的样本进行初步筛选,对初筛呈阳性的样品还需进一步采用焦磷酸测序加以鉴定。本研究建立的单管巢式PCR熔解曲线法的意义在于减少焦磷酸测序样本量(从340例减少至47例),节约了84%的焦磷酸测序成本,解决了单用焦磷酸测序或克隆测序在时间、经济方面的难题。

38例用单管巢式PCR熔解曲线法筛选、焦磷酸测序法证实的缺失突变样本,用直接PCR测序法只检出16例阳性样本,占42.1%,表明直接测序法的漏检率较高。我们在研究中发现,当将焦磷酸测序的阳性阈值定在0.1%和0.5%时,用单管巢式PCR熔解曲线法可出现假阳性结果,当阳性阈值定为1.0%时,敏感性达100%。考虑到初筛实验的关键是要防止漏检,我们将焦磷酸测序检测缺失突变比例的阳性阈值定为1.0%。

综上所述,本文建立的单管巢式PCR结合熔解曲线法应用于初筛HBV CP nt1758-1777缺失具有敏感性高和经济、简便的优点,该方法的建立不但可以用于临床大样本nt1758-1777缺失突变的检测,还可为HBV基因中其他短片缺失突变的大样本初筛检测提供借鉴。

【参考文献】

- [1] Liu Y, Zhong YW, Zou ZS, *et al.* Features and clinical implications of hepatitis B virus genotypes and mutations in basal core promoter/precore region in 507 Chinese patients with acute and chronic hepatitis B[J]. *J Clin Virol*, 2010, 47(3): 243-247.
- [2] Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, *et al.* Higher proportion of viral basal core promoter mutant increases the risk of liver cirrhosis in hepatitis B carriers[J]. *Gut*, 2015, 64(2): 292-302.
- [3] Wang Y, Liu Y, Xu ZH, *et al.* Up-regulation effect of G1764A/C1766T/T1768A triple mutations on the transcriptional activation of HBV core promoter[J]. *Med J Chin PLA*, 2010, 35(8): 954-957. [王耀, 刘妍, 许智慧, 等. G1764A/C1766T/T1768A三联突变对HBV核心启动子活性的上调作用研究[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(8): 954-957.]
- [4] Ren XQ, Xu ZH, Liu ZG, *et al.* Mutation and significance of HBV precore and basal core promoter in 958 patients with chronic hepatitis B[J]. *Med J Chin PLA*, 2009, 34(6): 663-665. [任晓强, 许智慧, 刘志国, 等. 958例乙型肝炎患者HBV前C/BCP区变异检测及其意义分析[J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(6): 663-665.]
- [5] Xu ZH, Ren XQ, Liu Y, *et al.* Association of hepatitis B virus mutations in basal core promoter and precore regions with severity of liver disease: an investigation of 793 Chinese patients with mild and severe chronic hepatitis B and acute-on-chronic liver failure[J]. *J Gastroenterol*, 2011, 46(3): 391-400.
- [6] Li XD, Liu Y, Xu ZH, *et al.* A complete genomic analysis of hepatitis B virus isolated from 516 Chinese patients with different clinical manifestations[J]. *J Med Virol*, 2013, 85(10): 1698-1704.
- [7] Chen WN, Oon CJ. Mutations and deletions in core promoter and precore stop codon in relation to viral replication and liver damage in Singaporean hepatitis B virus carriers[J]. *Eur J Clin Invest*, 2000, 30(9): 787-792.
- [8] Quetier I, Brezillon N, Revaud J, *et al.* C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein enhances the development of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96 (Pt 3): 614-625.
- [9] Sze KMF, Chu GKY, Lee JMF, *et al.* C-terminal truncated hepatitis B virus x protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by C-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1): 131-139.
- [10] Guo GH, Tan DM, Zhu PA, *et al.* Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF- β 1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(1): 59-64.
- [11] Expert Committee of Hepatitis B Virus Resistant. Expert consensus of hepatitis B virus resistant[J]. *Chin J Exp Clin Infect Dis*, 3(1): 72-79. [乙型肝炎病毒耐药专家委员会. 乙型肝炎病毒耐药专家共识[J]. *中华实验和临床感染病杂志*, 2009, 3(1): 72-79.]
- [12] Chinese Society of Infectious Diseases and Parasitology, and the Chinese Society of Hepatology, of the Chinese Medical Association. Management scheme of diagnostic and therapy criteria of viral hepatitis[J]. *Chin J Hepatol*, 2000, 8(6): 324-329. [中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝脏病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6): 324-329.]
- [13] Li XD, Liu Y, Xu ZH, *et al.* A complete genomic analysis of hepatitis B virus isolated from 516 Chinese patients with different clinical manifestations[J]. *J Med Virol*, 2013, 85(10): 1698-1704.
- [14] Ye XL, Liu Y, Chen RJ, *et al.* Analysis of evolution and virological characteristics of rtI233V mutations in the hepatitis B virus reverse transcriptase domain[J]. *Med J Chin PLA*, 2015, 40(3): 188-193. [叶晓玲, 刘妍, 陈荣娟, 等. 乙型肝炎病毒反转录酶区rtI233V变异的演变及病毒学特点分析[J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(3): 188-193.]
- [15] Wang YW, Shan XF, Huang Y, *et al.* A novel baseline hepatitis B virus sequencing-based strategy for predicting adefovir antiviral response[J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 33: 269-276.
- [16] Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, *et al.* Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 79(1): 25-30.
- [17] Li F, Zhang D, Li Y, *et al.* Whole genome characterization of hepatitis B virus quasispecies with massively parallel pyrosequencing[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(3): 280-287.
- [18] Chen J, Wang LL, Li Y, *et al.* Association analysis between SNPs in IL-28B gene and the progress of hepatitis B infection in Han Chinese[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50787.
- [19] Shang M, Huang Y, Hu X, *et al.* Association between SNPs in miRNA-machinery genes and chronic hepatitis B in the Chinese Han population[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 28: 113-117.
- [20] Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, *et al.* Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular

carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(16): 1134-1143.

[21] Shang HY, Cheng ZJ, Ou QS. Establishment of melt curve analysis for genotyping of hepatitis B virus[J]. Clin J Clin Lab Sci, 2011, 29(3): 225-227. [商红艳, 程祖建, 欧启水. 建立PCR熔解曲线法检测HBV基因型[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(3): 225-227.]

[22] Fu XY, Tan DM, Chen L, *et al.* Study on BCP quasispecies of genotype B with HBV and the clinical manifestation of HBV infection by melting curve[J]. Chin J Modern Med, 2011, 21(32): 4022-4031. [符小玉, 谭德明, 陈莉, 等. 熔点曲线法研究HBV基因B型BCP区变异与临床表现的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(32): 4022-4031.]

(收稿日期: 2015-12-16; 修回日期: 2016-01-23)

(责任编辑: 熊晓然)

· 信 息 ·

第十二届国际脑血管病高峰论坛征文通知

由南京军区南京总医院、南京大学医学院、《Interventional Neurology》杂志、世界卒中组织(WSO)联合主办的第十二届国际脑血管病高峰论坛定于2016年6月17—19日在南京召开。会议将邀请国内外知名专家就脑血管病及神经血管介入的热点问题进行研讨。注册代表将获国家级继续医学教育 I 类学分8分。

会议内容及指导思想: 瞄准国际脑血管病研究的最前沿, 把握神经血管介入技术的新动向, 突出创新, 倡导百家争鸣, 搭建展示我国脑血管病研究进展的国际舞台。会议议题包括脑血管病的急性期管理、急性脑梗死血管再通、溶栓及闭塞血管再通、脑血管综合评估、精准医学在脑血管病中的应用、脑血管病危险因素管理、卒中注册、遗传和基因研究、转化医学应用、神经修复及功能重建、动脉粥样硬化、神经影像学进展、痴呆和血管性认知功能损害、脑血管病护理和监护、神经血管介入手术护理等。

投稿类型: 中/英文摘要和(或)中文全文。被录用的中/英文摘要和全文将以论文集的形式刊印。同时将择优筛选部分全文, 发表在统计源期刊《医学研究生学报》。

征文要求: 杜绝一稿多投。提供Word格式小4号字, 2倍行距。①摘要必须为结构式摘要, 包括目的、方法、结果、结论四部分。排列顺序: 文题、作者姓名、作者单位、邮政编码、摘要、关键词, 并注明通讯作者的联系电话和E-mail。②全文包括图表在内, 临床研究及实验研究论著类不超过4000字, 文献综述类不超过6000字, 全文需附中、英文摘要(400~500字)。

投稿请通过E-mail加附件的形式提交至iss_nanjing@163.com或通过大会网站www.stroke.net.cn在线提交。截稿日期: 2016年5月20日。

联系方式: 南京市中山东路305号南京军区南京总医院神经内科(邮编210002); 联系人: 林颖; 电话: 025-80863481; 传真: 025-84664563; E-mail: iss_nanjing@163.com; 会议网址: <http://www.stroke.net.cn>。

国际脑血管病高峰论坛组委会

2016年1月25日