

• 论著 •

我国丁型肝炎病毒全基因克隆及序列分析

马建^{1,*}, 辜文洁^{1,*}, 贾雪荣², 黄维金¹, 梁争论¹, 王佑春¹

1. 中国食品药品检定研究院,北京 100050; 2. 北京万泰生物药业股份有限公司,北京 102206

摘要:为构建我国丁型肝炎病毒(HDV)全基因克隆,分别从3份HDV阳性血清中提取病毒RNA,通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分段扩增,获得4个相互重叠的DNA片段,将PCR产物测序,利用DNASTar软件拼接,获得HDV全基因组序列;设计引物,用重叠PCR扩增全长HDV片段并连接至克隆载体,构建全基因克隆。结果成功克隆出3株1 675 bp的HDV全长基因组。经与GenBank标准序列比对,3株HDV均为基因Ib型,核酸序列同源性达98%以上,与我国I型X77627的同源性均达98%以上,与其他基因I型的同源性均高于84%。与基因II型和III型的同源性分别低于77%和66%。本研究构建了3株具有我国代表性的HDV全长基因cDNA克隆,为进一步开展HDV分子生物学研究提供了基础。

关键词:丁型肝炎病毒;聚合酶链反应;全基因组

Cloning and sequence analysis of full-length cDNA of hepatitis D virus in China

MA Jian^{1,*}, GU Wen-Jie^{1,*}, JIA Xue-Rong², HUANG Wei-Jin¹, LIANG Zheng-Lun¹, WANG You-Chun¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Beijing 102206, China

Abstract: The present paper aims to clone and analyze the sequence of full-length cDNA of hepatitis D virus (HDV) in China. HDV RNA was extracted from three HDV seropositive samples. cDNA was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Four overlapped fragments were amplified by nested PCR, and the products were sequenced. The full-length sequences were joined by DNASTar. The full-length cDNA of HDV was amplified by overlapping PCR using designed primers and connected to the cloning T vector. Three strains of HDV were successfully amplified and cloned. The three HDV strains were all genotype Ib. The nucleic acid sequence homology of the three HDV strains was over 98%. They had over 98% sequence homology to genotype I Chinese strain X77627, and >84% sequence homology to other genotype I strains. They had no more than 77% and 66% sequence homology to genotype II and genotype III respectively. In conclusion, we cloned full-length cDNA of three strains of HDV, which could be helpful for the further study of HDV molecular biology.

Key words: Hepatitis D virus; Polymerase chain reaction; Full-length genome

丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)是一种缺陷病毒,必须依靠乙型肝炎病毒(hepatitis B

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2012ZX10004701)

通信作者:黄维金

Corresponding author. HUANG Wei-Jin, E-mail: huangweijin@nifdc.org.cn

* 同为第一作者

virus, HBV)才能复制增殖。其基因组为单股负链 RNA, 长约 1.7 kb, 呈环状, 比任何已知的动物病毒基因组都要小。HDV 基因链及抗基因链上有多个开放读码框架(open reading frame, ORF), 但只有抗基因 RNA 链上的 ORF 编码 HDV 抗原(HDV antigen, HDAg)——HDAg-L 和 HDAg-S。HDAg-L 比 HDAg-S 在 C 端多 19 个氨基酸, 通过 RNA 编辑, HDAg-S 的终止密码子 UAG 变成 UGG, 翻译产生 HDAg-L^[1]。

HDV 基因型分 3 类(I型、II型、III型)。II型与 I型同源性为 75%, III型与 I型、II型同源性为 60%~65%。本研究通过反转录获得 cDNA 片段, 用套式聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)获得大量拷贝, 进行测序及克隆, 并将测序结果与 I型、II型、III型序列比对分析。

1 材料与方法

1.1 样品来源

3 份 HDV 血清学阳性样品编号分别为 1048#、1054#、255#, 其中 1048# 和 1054# 来源于中国食品药品检定研究院肝炎病毒疫苗室收集的 HBV 表面抗原(HBV surface antigen, HBsAg)阳性血库, 255# 由北京万泰生物药业股份有限公司收集。样品分别来自四川、湖南和湖北。

1.2 主要材料

病毒核酸提取试剂、胶回收试剂购自 Qiagen 公司, AMV 反转录酶购自 Promega 公司, PrimeStar® HS DNA 聚合酶、T 载体、感受态细胞购自 TaKaRa 公司, 琼脂糖购自 Biowest 公司, 引物合成及 PCR 结果测序由上海英骏生物技术有限公司及北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。乙型肝炎 5 项检测试剂为 ARCHITECT i2000 化学发光试剂, 购自 Abbott 公司。HDV Ig、HDV IgM 检测试剂由北京万泰生物药业股份有限公司提供, HDAg 检测试剂购自北京贝尔生物工程有限公司。

1.3 引物设计

根据已发表的文献及以前的研究结果^[2], 设计 RNA 阳性筛选引物、全长序列拼接套式 PCR 引物及全长克隆重叠 PCR 引物。引物序列见表 1。

1.4 HDV RNA 提取、反转录及 PCR 扩增

1.4.1 RNA 提取 按 QIAamp Viral RNA Mini Kit 使用说明, 将 Carrier RNA 和 Buffer AVE 配

成 1 μg/μl 溶液。于 1.5 ml Eppendorf 管中, 将 5.6 μl Carrier RNA-Buffer AVE 按 1:100 的比例加至 560 μl Buffer AVL, 再加入 140 μl 血清, 混匀, 室温放置 10 min; 加入 560 μl 96% 乙醇, 混匀; 分两次加入吸附柱, 分别用 Buffer AW1 和 Buffer AW2 洗 1 次, 甩干; 加入 60 μl Buffer AVE 洗脱, 获得 RNA。

1.4.2 反转录 取 PCR 管, 加入 RNA 模板 14 μl、下游引物 0.6 μl、RS(RNA 酶抑制剂)0.1 μl, 于 72 °C 反应 5 min; 取出, 立即冰浴 5 min, 每管加入 5×Buffer 4 μl、dNTP(10 mmol/L) 1 μl、RS 0.1 μl、AMV 酶 0.2 μl, 42 °C 反转录 40 min, 获得 20 μl cDNA 产物。

1.4.3 PCR 扩增 HDV RNA 阳性样品筛选如下。以引物 1 反转录得到的 cDNA 为模板, 配置 50 μl 反应体系: 上游引物(20 μmol/L)0.75 μl、下游引物(20 μmol/L)0.75 μl、dNTP(2.5 mmol/L)4 μl、5×PrimeSTAR® Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶(2.5 U/μl)0.5 μl、cDNA 5 μl, ddH₂O 补至 50 μl。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。以上 PCR 产物经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 为 405 bp 产物, 将该产物直接送公司测序。

1.5 HDV RNA 分片段扩增

根据文献报道设计引物, 将 HDV 全基因分为 4 个片段, 以反转录后的 cDNA 为模板, 利用引物 2 ~9 进行套式 PCR 扩增。50 μl PCR 反应体系: 外引物上游引物(20 μmol/L)0.5 μl、外引物下游引物(20 μmol/L)0.5 μl、dNTP(2.5 mmol/L)4 μl、5×PrimeSTAR® Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶(2.5 U/μl)0.5 μl、cDNA 5 μl, ddH₂O 补至 50 μl。使用递减式 PCR 反应条件, 程序为: 98 °C 1 min; 98 °C 30 s, (65 ± 0.5) °C / 循环, 72 °C 扩增(1 kb/min), 进行 20 个循环; 98 °C 30 s, 55 °C / 循环, 72 °C 扩增(1 kb/min), 进行 15 个循环; 72 °C 10 min。4 °C 保存。套式 PCR 第 1 轮: 引物为外引物, 模板为反转录产物 cDNA; 第 2 轮: 内引物、模板为第 1 轮产物, 反应方法同第 1 轮。PCR 产物经 2% 凝胶电泳, 鉴定为 4 个相互重叠的片段。

表 1 用于筛选阳性 HDV RNA 样品及全基因克隆的引物

Tab. 1 Primers for detection of HDV RNA and full-length cDNA clone

| No. | Upstream | Sequence (5'-3') | Downstream | Sequence (5'-3') | Object |
|-----|-----------------|---|-----------------|--|--|
| 1 | A | GAAGGAAGGCCCTCGAGAA- CAAGA | EF3 | TGCCATGCCGACCCGAAGAG- GAAA | Screening of HDV RNA positive sera |
| 2 | AI1 | ATGAACGGTAAAGAGCATT- GGAT | AO1 | CCATCTCCGAGCGAAGGGAA | Sequencing |
| 3 | AI2 | GCGAACACCCCACCGACTAG | AO2 | TCCGGGAGCTGCTATGTGGG | |
| 4 | BI1 | GGGGCTAGTCGGTGGGTGTT | BO1 | AGACCAGAACGAGGAGGAA- AGTAA | |
| 5 | BI2 | GGTCGTGTCTCGCGTCCTT | BO2 | AAGCGGGTTTCCACTCACG | |
| 6 | CI1 | AGATGCCATGCCGACCCGAA | CO1 | TTCGGATGCCAGGTGCG | |
| 7 | CI2 | GGCCTCACAGAGGGAGGGTTCT | CO2 | GGCCCGAACGAACCAAGAT | |
| 8 | DI1 | CCTTCCTCGTCGGTGAT | DO1 | TCCCTGCTGAGGTGCTTCC | |
| 9 | DI2 | CCTTCGATGATCCAATGCT | DO2 | CGCCATAGGGAGGTCGTC | |
| 10 | AF255 | ACGGTAAAGAGCATTGGATC- ATCGAAGGTAAGTCCCCAA- GAAGGAAAAAAGAGA | AR255 | GGCGGAACACCCCACCGACT- AGCCCCGT | Full-length clone |
| | AF1048/ 1054 | CGCGGATCCAAAGAGAAAG- CAAGAGACGGACGAC | AR1048/ 1054 | TGGGGACGATTGCCGAGTT- CCCCGGGATAAGCCTCACT- CGTCCCCTCTCGGGA | |
| 11 | BF255 | TCCCGAGAGGGGACGAGTG- AGT | BR255 | CTCACGGGTTCGTGTCTCGCG- TCCTTCTTCCTCTCGGGTC- GGCATGGCATCT | |
| | BF1048/ 1054 | TCCCGAGAGGGGACGAGTG- AGGCTTATCCGGGGAACT- CGGCGAACATCGTCCCCA | BR1048/ 1054 | GGTCGTGTCTCGCGCCTTC- TTTCC | |
| 12 | CF255 | AGATGCCATGCCGACCCGAA- GAGGAAAGAACGGACGCGA- GACACGAACCCGTGAG | CR255 | TGCCTAGGAAGAGGCCTCAC- AGAGGAGGGTTCTCGACA- AGGAGAGGGAGGATC | |
| | CF1048/ 1054 | CGTGAGTGGAAACCCGCTTT- ATTCACT | CR1048/ 1054 | CGTGCCTAGGAAGAGGCCTC- ACAGAGGAGGGTTCTCCGA- CAAGGAGAGGGAGGA | |
| 13 | DF255 | GATCCTCCCTCTCCTTGTGG- AGAACCCCTCCTGTGAGG- CCTCTCCTAGGCA | DR255 | TCTCTTTTCTCTTGGGG- ACTTACCTTCGATGATCCA- ATGCTTTACCGT | |
| | DF1048/ 1054 | TCCTCCCTCTCCTGTGGAA- GAACCCCTCCTGTGAGGCA- CTCTCCTAGGCA | DR1048/ 1054 | ACGCGTCGACTTCTTCTTGT- GGGACTTACCTTCGA | |

1.6 HDV 全基因的 PCR 扩增及克隆

将以上 PCR 产物直接送公司测序,根据测序结果用 DNAStar 软件进行拼接和分析,获得 3 个样品的全基因序列。分析该序列,设计针对相对保守区域的 4 对重叠互补的引物(表 1,引物 10~13),以上述 4 片段第 2 轮套式 PCR 产物为模板,扩增获得 4 个片段。然后用重叠 PCR 将 4 个片段连接成贯穿 HDV 全基因的全长片段,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测、凝胶回收试剂盒回收,连接至 T 载体,质粒用核酸内切酶 *Xba* I 和 *Eco* R V 进行鉴定,获得 3.5 kb 和 780 bp 两条带,酶切鉴定结果与理论序列一致。

1.7 全基因克隆的测序和序列分析

用 DNAStar 软件进行序列分析,所用病毒株全基因序列选自 GenBank。

表 2 3 份样品的 HDV 血清学指标

Tab. 2 Serological results of three HDV-positive samples

| Sample | HBsAg | HBsAb | HBeAg | HBeAb | HBcAb | HDV Ig | HDV IgM | HDAG |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|------|
| 1048# | + | - | + | - | + | + | - | - |
| 1054# | + | - | + | - | + | + | - | - |
| 255# | + | - | - | - | + | + | - | - |

2.3 HDV 全基因克隆

用 *Xba* I 和 *Eco* R V 对 HDV 全基因克隆产物进行双酶切鉴定,酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 1 所示,可见 3.5 kb 和 780 bp 两条带,与预计大小一致。

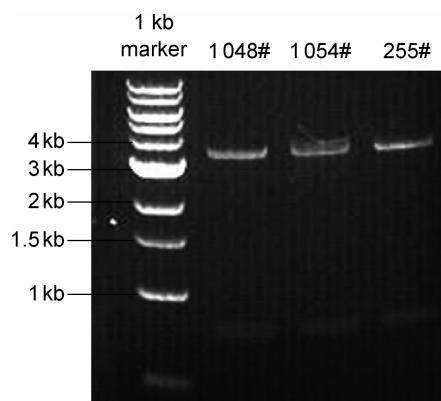


图 1 HDV 全基因 cDNA 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of full-length cDNA of HDV by enzyme digestion

2.4 序列分析

将 3 株 HDV 序列与基因型 I、II、III 进行同源

2 结果

2.1 血清学指标检测

利用试剂盒对乙型肝炎 5 项及 HDV Ig、HDV IgM、HDAg 等进行检测,结果见表 2。255# 样品为 HBsAg、HBV 核心抗体(HBC core antibody, HBcAb) 阳性, HBV e 抗原(HBV e antigen, HBeAg) 阴性。而 1048# 和 1054# 样品为 HBsAg、HBeAg、HBcAb 均强阳性。3 份样品的 HDV IgM、HDAg 均为阴性,HDV Ig 为阳性。

2.2 拼接序列结果

用 DNAStar 软件进行序列拼接,拼接完成后,将获得的全长序列并提交至 GenBank(登录号:1048# 为 KR363257,1054# 为 KR363258,255# 为 KR363259)。

性分析,分析所用序列来自 GenBank。通过 DNAStar 软件进行核苷酸序列比对分析,确定 1048#、1054# 和 255# 均为 I 型,且 3 株的同源性达 98% 以上,与我国 I 型 X77627^[3] 的同源性也达 98% 以上,与 Makino 等^[4] 分离的 I b 型和 Chao 等^[5] 分离的 I a 型的同源性分别为 94% 以上和 84% 左右,因此均为 I b 型。与 II a 型的同源性达 75% 以上,但均不超过 77%,与 II b 型的同源性低于 75%;与 III 型的同源性不超过 66%。II a 型和 II b 型的组内同源性均为 80% 以上。序列进化树结果见图 2,同源性分析结果见表 3。

2.5 HDAg 蛋白序列分析

HDAg 有两种,分别是 24 000 的 HDAg-S 和 27 000 的 HDAg-L^[6,7]。HDAg-S 在病毒复制中起重要作用^[8],而 HDAg-L 抑制病毒复制,促进病毒组装^[9]。通过序列分析,1048# 编码区位于 1 010~1 594 位碱基,编码 HDAg-S;1054# 编码区位于 953~1 594 位碱基,255# 编码区位于 953~1 594 位碱基,编码 HDAg-L。

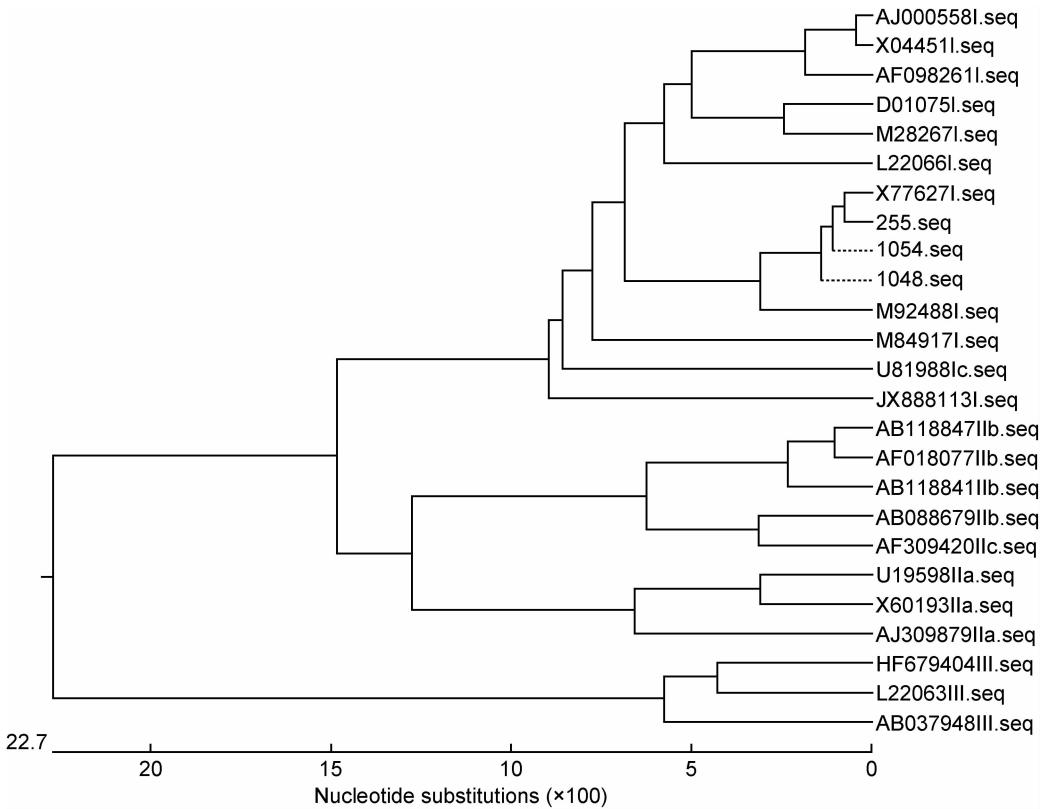


图 2 HDV 全基因组序列进化树分析

Fig. 2 The phylogenetic tree analysis of full-length cDNA of HDV

表 3 1048#、1054# 和 255# 与各基因型 HDV 序列的同源性比较

Tab. 3 Comparison of homology among different HDV genotypes

| Genotype | 1054# (%) | 1048# (%) | 255# (%) |
|--------------|-----------|-----------|----------|
| X77627 I | 98.7 | 98.6 | 98.5 |
| M92488 I | 94.6 | 94.3 | 94.3 |
| D01075 I | 87.8 | 87.7 | 87.5 |
| AJ000558 I | 87.4 | 87.4 | 87.6 |
| X04451 I | 87.3 | 87.6 | 87.6 |
| M28267 I | 87.2 | 87.1 | 87.2 |
| AF098261 I | 86.7 | 87.0 | 87.1 |
| M84917 I | 85.6 | 85.8 | 85.7 |
| U81988 Ic | 84.8 | 84.8 | 85.1 |
| U19598 IIa | 75.8 | 75.3 | 76.2 |
| AJ309879 IIa | 75.6 | 75.2 | 75.8 |
| X60193 IIa | 75.3 | 74.9 | 75.6 |
| AJ309880 IIa | 75.2 | 75.0 | 75.8 |
| AB118841 IIb | 74.1 | 74.0 | 74.0 |
| AF018077 IIb | 74.1 | 73.8 | 73.9 |
| AB118847 IIb | 73.9 | 73.6 | 73.8 |
| AB088679 IIb | 72.7 | 72.7 | 72.2 |
| AF309420 IIc | 72.5 | 72.4 | 72.3 |
| AB037948 III | 64.7 | 64.5 | 65.1 |
| L22063 III | 64.7 | 64.5 | 64.2 |

将 1048#、1054#、255# 的 HDAg 序列与 I 型 HDAg 进行比较分析,发现 3 株病毒氨基酸变异主要发生在 N↔K/S/R/D(N9、S170、D77)、E↔D(E29、D33、E47)、L↔A(L34)、S↔P(S148、P175) 等,大部分氨基酸的突变为半保守性突变或非关键位点突变,氨基酸性质并未改变。关键氨基酸位点分析如下:在病毒核酸转运和复制的关键位点(R13、K72、S177)均未发生突变;1054#、1048# 均在 N48 位发生突变(N48H),1048#、255# 发生两个氨基酸突变(S83T、G84V),255# 在 N121 发生突变(N121L),由极性中性氨基酸变为非极性疏水性氨基酸。C 端异戊烯化位点 CXXX^[10]无变化,不影响 HDV RNA 与 HDAg-L 装配成 HDV 颗粒。

3 讨论

目前,我国有生产批准文号的 HDV 诊断试剂厂商有 6 个(其中 1 家进口试剂,5 家国产试剂)。进口试剂采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),检测 HDV Ig 和 HDV IgM。国产试剂中 1 种采用化学发光法,分别检测 HDV IgG 和 HDV IgM;另外 4 种均采用 ELISA,1 种检测 HDV Ig、HDAg 和 HDV IgM,

1 种检测 HDV IgM, 2 种检测 HDV IgG 和 HDV IgM。目前尚无用于 HDV 感染早期诊断的核酸检测试剂。本研究中 3 份样品核酸阳性, 表明有病毒存在; 但 HDAg、HDV IgM 为阴性, 仅两家公司试剂检测 HDV Ig 阳性, 其他公司试剂检测结果均为阴性^[2], 表明 HDV 诊断试剂的整体质量有待提高。

HDV 的基因型分布具有明显的地域性差异。目前已知 HDV 有 3 种基因型, 分别为 I、II、III 型, 我国以 I 型为主。本实验通过对 3 株 HDV 全序列进行分析, 确定均属于 I b 型, 并与我国首次报道^[3]的 I 型 X77627 有很高的同源性, 也支持了我国 HDV 多为 I 型的结论。

本研究中 3 株 HDV 来源于我国不同地区。分析其 HDAg 序列时发现, 虽然该 3 株 HDV 均属于基因 I 型, 但 255# 与 1048# 和 1054# 存在不同变异。3 株 HDV 在多处发生同族氨基酸变异, 但关键位点未发生改变。12~60 位氨基酸为聚合区^[11], 1054#、1048# 均在 N48 位发生突变 (N48H); 68~88 位氨基酸为核酸定位信号区^[12], 帮助 HDAg 进入细胞核, 1048#、255# 在该区域发生两个氨基酸突变 (S83T、G84V); 另外 97~146 位氨基酸为核酸结合区^[13], 255# 在 N121 发生突变 (N121L), 由极性中性氨基酸变为非极性疏水性氨基酸。目前 HDAg 试剂均未检出, 推测这些位点可能对 HDAg 的检出影响不大, 但是否与试剂灵敏度有关尚不明确, 需进一步验证。

有报道指出, HDV 的不同基因型别与病情程度及肝炎类型相关^[14,15], 且发现肝炎症状越明显, HDV RNA 变异越高^[14]。HDV 易发生变异, 不同国家不同地域的 HDV 序列不同, 且不同型别的病毒引起肝损伤的程度也不同, 其中 III 型基因变异较大, 易引发重症肝炎。由于 HDV 结构特殊, 反转录很难获得足够长的 DNA, 本研究参考相关文献并结合以前工作, 用反转录 PCR、重叠 PCR 成功获得 3 株 I 型 HDV 的完整序列, 完善了我国 HDV 全基因信息, 为探索 I 型和 III 型 HDV 的致病性差异、感染性、复制机制等分子生物学研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 李晓娟, 况二胜, 杨复华. 丁型肝炎病毒的分子生物学研究进展 [J]. 中国病毒学, 2003, 18(3): 298-302.
- [2] 辜文洁, 黄维金, 周诚, 乔杉, 伍波, 吴星, 姚昕, 蓝海云, 梁争论. 不同 HDV 诊断试剂对 HBsAg 阳性样品的检测分析 [J]. 中国药事, 2011, 25(9): 866-868, 879.
- [3] 刘善虑, 詹美云, 谭文杰. 中国河南株丁型肝炎病毒全基因组的 cDNA 克隆和序列分析 [J]. 病毒学报, 1994, 10(2): 97-107.
- [4] Makino S, Chang MF, Shieh CK, Kamahora T, Vannier DM, Govindarajan S, Lai MM. Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (δ) virus RNA [J]. Nature, 1987, 329(6137): 343-346.
- [5] Chao YC, Lee CM, Tang HS, Govindarajan S, Lai MM. Molecular cloning and characterization of an isolate of hepatitis delta virus from Taiwan [J]. Hepatology, 1991, 13(2): 345-352.
- [6] Bergmann KF, Gerin JL. Antigens of hepatitis delta virus in the liver and serum of humans and animals [J]. J Infect Dis, 1986, 154(4): 702-706.
- [7] Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope [J]. J Virol, 1986, 58(3): 945-950.
- [8] Chao M, Hsieh SY, Taylor J. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication [J]. J Virol, 1990, 64(10): 5066-5069.
- [9] Chang FL, Chen PJ, Tu SJ, Wang CJ, Chen DS. The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(19): 8490-8494.
- [10] 刘红, 叶荣. 病毒蛋白脂酰化及其功能 [J]. 微生物与感染, 2014, 9(2): 122-130.
- [11] Zuccola HJ, Rozzelle JE, Lemon SM, Erickson BW, Hogle JM. Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen [J]. Structure, 1998, 6(7): 821-830.
- [12] Xia YP, Lai MM. Oligomerization of hepatitis delta antigen is required for both the trans-activating and trans-dominant inhibitory activities of the delta antigen [J]. J Virol, 1992, 66(11): 6641-6648.
- [13] Lee CZ, Lin JH, Chao M, McKnight K, Lai MM. RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication [J]. J Virol, 1993, 67(4): 2221-2227.
- [14] Lee CM, Bih FY, Chao YC, Govindarajan S, Lai MM. Evolution of hepatitis delta virus RNA during chronic infection [J]. Virology, 1992, 188(1): 265-273.
- [15] Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(19): 9016-9020.

(收稿日期: 2015-07-29)