

湖北麻鸭乙型肝炎病毒全基因组的克隆和序列分析*

胡 权¹, 雷延昌¹, 张振华¹, 田拥军, 张正茂¹, 李 磊¹,
夏剑波¹, 陆蒙吉^{2,3}, 杨东亮^{1**}

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室, 湖北武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院微生物学教研室, 湖北武汉 430030; 3. Institute of Virology, Medical School of Essen University, Essen 45122, Germany)

Cloning and Sequence Analysis of Duck Hepatitis B virus Genome from Hubei Brown Ducks

HU Quan¹, LEI Yan-chang¹, ZHANG Zhen-hua¹, TIAN Yong-jun, ZHANG Zheng-mao¹,
LI Lei¹, XIA Jian-bo¹, LU Meng-ji^{2,3}, YANG Dong-liang^{1**}

(1. Division of Clinical Immunology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (HUST), Wuhan 430030, China; 2. Department of Microbiology, Tongji Medical College of HUST, Wuhan 430030, China; 3. Institute of Virology, Medical School of Essen University, Essen 45122, Germany)

Abstract : Seventy serum samples were collected from adult brown ducks in Hubei were collected in order to clarify the natural *Duck hepatitis B virus* (DHBV) infection in and to characterize the genome structure of DHBV. The complete genome of the DHBV strain was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into T vector and sequenced. The results showed that the natural infection rate of DHBV in Hubei was 10%. The DHBV genome isolated by PCR (GenBank accession number DQ276978) had 3 024 nucleotides with three overlapping reading frames encoding the surface, core and the polymerase proteins, respectively. Comparison of genome sequences of this strain with those of 17 DHBV strains from the GenBank revealed an identity from 89.3% to 93.5% at the nucleotide level. The amino acid sequences of the S protein, core protein, and functional domain of the Pol protein were highly reserved among all of these DHBV strains. This Hubei strain was found to share more signature amino acids in the polymerase genes with the “Chinese” DHBV strains than those of the “Western” country strains. This finding was also corroborated by a phylogenetic tree analysis. Therefore, this Hubei DHBV strain should be classified to a subtype of the Chinese strains.

Key words : Duck hepatitis B virus ; Cloning; Sequence analysis

摘要 : 为了解湖北地区 This finding was also confirmed by the phylogenetic tree analysis. 麻鸭中鸭乙型肝炎病毒(*Duck hepatitis B virus*, DHBV)自然感染状况以及湖北麻鸭所携带 DHBV 的基因结构特征, 采集了 70 份成年麻鸭血清并应用 PCR 技术检测 DHBV DNA, 对其中一份 DHBV DNA 阳性血清进行 DHBV 全基因扩增, 并进行克隆与序列测定分析。结果表明, 湖北麻鸭 DHBV 自然携带率为 10%; 湖北 DHBV 分离株 (GenBank 登录号 DQ276978) 基因组的全长为 3024bp, 有编码 P, S 和 C 蛋白的三个开放阅读框; 与 GenBank 中 17 株 DHBV 基因组比较, 核苷酸同源性介于 89.85%~93.29% 之间; S 蛋白、C 蛋白和 P 蛋白结构功能区序列均高度保守; 而对 P 蛋白标志性氨基酸和全基因进化树的分析表明, 该分离株属于 DHBV 中国基因型中的一个亚型。

关键词 : 鸭乙型肝炎病毒; 克隆; 序列分析

收稿日期: 2005-09-09, 修回日期: 2005-12-18

* 基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA705B05); 国家自然科学基金(30271170)

作者简介: 胡 权(1970-), 男, 武汉市籍, 博士研究生, 主要从事乙型肝炎病毒感染动物模型的研究。

** 通讯作者: 杨东亮, 教授, 博士生导师, Corresponding author. Tel: 027-83662894, E-mail: dlyang@tjh.tjmu.edu.cn

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0163-06

鸭乙型肝炎病毒 (*Duck hepatitis B virus*, DHBV) 与人乙型肝炎病毒 (HBV) 同属嗜肝 DNA 病毒科, 它们在形态结构、基因序列、病毒复制、致病机理及感染宿主规律等方面均较为相似。嗜肝动物模型使人们得以认识嗜肝病毒的复制周期以及病毒持续存在和病毒清除的机制。通过体外转染和体内感染的方法可研究嗜肝病毒生命周期中各种病毒基因的作用, 如前 C 区基因、X 基因、转录调节元件以及结构基因和病毒聚合酶的重要功能区域。因此, DHBV 感染鸭模型对研究 HBV 基因突变、细胞表面病毒受体、病毒清除机制和筛选新的抗病毒药物等方面有一定预示价值的动物模型。本实验通过调查湖北地区麻鸭自然携带 DHBV 的情况, 进而对分离出的一株 DHBV 新毒株进行全基因组克隆和序列分析, 为建立湖北麻鸭乙型肝炎动物模型提供必要的前提条件。

1 材料与方法

1.1 鸭种

70 只湖北麻鸭购自武汉市江夏区某鸭场, 经腿静脉采血, 血清分离后置 -20℃ 保存, DHBV DNA 阳性的鸭肝组织于 -80℃ 低温保存。

1.2 试剂

LA Taq 酶、pMD18-T 载体购自日本 Takara 公司; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Nco* I 和 Taq DNA 聚合酶购自美国 Promega 公司; DNA 凝胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司。地高辛标记和检测试剂盒购自德国 Roche 公司。

1.3 引物

根据 GenBank 公布的 17 株 DHBV 基因全长序列, 参考有关文献^[1, 2]的引物设计策略, 在 DHBV S 区和 C 区的高度保守序列段分别设计引物 Ps1/Ps2 和 Pc1/Pc2, 用来筛选 DHBV 阳性血清; 在 DHBV 负链开环缺口处设计引物 P1/P2, 用来扩增 DHBV 全长基因组。引物具体序列如下: Ps1 (nt1318F) 5'-TGGCCTAATCGGACTACTGG-3', Ps2 (nt1739R) 5'-CAGCGTGGCTAATTGAGTTA-3', Pc1 (nt187F) 5'-GCAATCACTAGACCAATCCA-3', Pc2 (nt397R) 5'-GAGATCTATGGTGGCTGCTC-3', P1 (nt2538F) 5'-CCGGTCGACAATTACACCCCTCTCCTTCGGA GC-3', P2 (nt2542R) 5'-CCGGTCGACTAATTC TTAAGTTCCACATAGCC-3'。

1.4 血清 DHBV DNA 的提取

100μL 血清加 2 倍的裂解缓冲液 TES 和 150μg/mL 的蛋白 K, 56℃ 裂解 2h, 等量酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提, 两倍体积的无水乙醇沉淀, 70% 的乙醇洗涤后, 25μL TE (pH8.0) 溶解, -20℃ 冻存。

1.5 血清 DHBV DNA 的检测

用引物 Ps1/Ps2 和 Pc1/Pc2, 通过 PCR 扩增血清提取物, 筛选 DHBV 阳性血清。PCR 循环参数: 94℃ 5min; 94℃ 50sec, 61℃ 45sec, 72℃ 50sec, 40 个循环; 72℃ 10min。产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 肝组织总 DNA 的提取

肝组织总 DNA 的提取按常规方法进行。50mg 的肝组织匀浆后加 1mL lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, 0.5% 的 SDS, 0.5 mg/mL proteinase K) 55℃ 裂解 3h, 等体积酚-氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, TE 溶解, RNA 酶 20μg/mL 37℃ 消化 1h, 酚-氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, 溶于 20μL TE。

1.7 Southern Blot 分析

20μg 的总 DNA 以 1.0% 的琼脂糖凝胶分离, 然后用碱性转移法转印到 GeneScreenPlus 尼龙膜上, 与 DIG 标记的 DHBV 全长基因组探针杂交 (DHBV 全长克隆质粒 pSP65-DHBV16 由张永源教授馈赠), X-ray 胶片发光显影。

1.8 DHBV 全基因的扩增

用引物 P1/P2 扩增全长基因组。其 PCR 反应液组成: TakaRa LA Taq (5U/μL) 1μL; 10× LA PCR 缓冲液 (MgCl²+ plus) 5μL; dNTP (10mmol/L) 1μL; P1 (10μmol/L) 0.5μL; P2 (10μmol/L) 0.5μL; DHBV 模板 5μL; 加灭菌纯水至 50μL。PCR 循环参数: 94℃ 40s, 62℃ 1.5min, 68℃ 3min, 10 个循环; 94℃ 40s, 62℃ 1.5min, 68℃ 3.5min, 10 个循环; 94℃ 40s, 62℃ 1.5min, 68℃ 4min, 10 个循环, 最后 68℃ 延伸 8min。取 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 将 3kb 的 DNA 目的条带切下后, 用小量凝胶回收试剂盒回收。

1.9 克隆测序

将回收的 PCR 目的片段克隆到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 经蓝白斑筛选获得可能插入回收的 DNA 的白色菌落, 用小量质粒提取试剂盒提取质粒, 并进行酶切和 PCR 鉴

定。将重组质粒送上海生物工程技术服务公司测序。

1.10 同源性比较

核苷酸序列分析用 MCLONE 软件, 氨基酸分析用 DNA Tools 软件, 进化树分析采用 CLUSTAL W 和 TreeView 软件。

2 结果

2.1 血清和肝组织 DHBV DNA 的检测

引物 Ps1/Ps2 和 Pc1/Pc2 的扩增产物长度分别为 452bp 和 211bp, 70 只湖北麻鸭中有 7 只 S 区和 C 区特异性引物扩增结果为阳性, 阳性率为 10.0%。Southern blot 分析结果显示, 7 只感染鸭肝内均有高滴度的病毒复制, 可见 rcDNA (松弛环状 DNA, 约 4.0kb 片段) cccDNA (共价闭环环状 DNA, 为 3.2kb-2.1kb 片段) 及 ssDNA (单链线型 DNA, 为 <1.9kb 大小片段) 等 DHBV DNA 复制中间体。

2.2 DHBV 全基因组扩增和克隆

引物 P1/P2 长链 PCR 扩增血清中 DHBV 可得到大约 3kb 大小的产物。全长 DHBV DNA 扩增产物纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化至受体菌 JM109, 经蓝白筛选, 用 S 区和 C 区保守序列特异

性引物 Ps1/ Ps2 和 Pc1/ Pc2 进行 PCR 筛选, *Sal I* 酶切鉴定, 阳性克隆进行序列测定。

2.3 DHBV 全基因克隆 DNA 序列分析

用 DNA Tools 软件对 DHBV 全基因克隆进行分析显示, 基因组全长 3024bp, 有 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 分别为 P-ORF (170-2533nt)、PreS/S-ORF (693-1790nt)、PreC/C-ORF (2521-3024, 1-414nt), 分别编码 P 蛋白、S 蛋白和 C 蛋白。该克隆与 GenBank 公布的 17 株 DHBV 全基因组的同源性介于 89.85%~93.29%之间 (表 1), 其中与 X58569 (上海株) 同源性最高, 为 93.29%; 与 X74623 (印度株) 同源性最低, 为 89.85%。Triyatni^[3]将 GenBank 数据库中来源于世界各地的 DHBV 分离株的克隆序列进行分析, 发现 DHBV 基因型的分布具有明显的地理学特点, 可分为中国基因型(“Chinese” isolates) 和西方基因型 (“Western” country isolates), 中国基因型所有分离株的核苷酸平均离散率(mean nucleotide divergence) 为 6.06%, 明显高于西方基因型的核苷酸离散率 0.92%。该克隆与中国基因型和西方基因型相比, 核苷酸平均离散率分别为 7.57%和 9.71%, 提示该分离株更接近于中国基因型。

表 1 DHBV 全基因克隆与 GenBank 中 17 株 DHBV 核苷酸序列及各编码区氨基酸同源性比较
Table 1 Homology analysis with the 17 isolates from GenBank

GenBank ID	Genomic Length(nt)	Origin		Reference	Nucleotide Identity(%)	Amino acid(%)		
		Avian species	Location			C region(262)	S region(167)	P region(787)
Chinese' DHBV								
M32990	3027	brown Duck	Shanghai	Uchida, et al.(1989)	92.82	98.85	95.21	89.83
M32991	3027	white Duck	Shanghai	Uchida, et al.(1989)	91.70	98.09	94.01	87.42
NC001344	3027	domestic Duck	China	Tong, et al. (1990)	92.33	98.09	93.41	89.45
X60213	3027	domestic Duck	Shanghai	GenBank	92.33	98.09	93.41	89.45
AJ006350	3027	Pekin Duck	Australia	Trivatni M, et al.(2001)	91.37	97.33	93.41	86.66
M21953	3024	domestic Duck	Shanghai	Tong, et al.(1990)	92.33	98.47	96.41	88.95
X58568	3024	domestic Duck	Chian	Sprengel, et al.(1991)	93.15	96.95	95.21	90.72
X58569	3024	domestic Duck	Shanghai	Sprengel, et al.(1991)	93.29	96.95	96.41	90.09
AF404406	3024	brown Duck	Chongqian	Hu J, et al.(2001)	92.59	98.47	98.20	88.95
Westem country' DHBV								
K01834	3021	Pekin Duck	USA	Mandart, et al.(1984)	90.34	96.18	97.01	86.02
M60677	3021	Pekin Duck	USA	GenBank	90.51	96.18	97.01	86.02
AF493986	3021	domestic Duck	USA	Wang C, et al.(2002)	90.41	96.18	97.01	86.15
AF505512	3021	domestic Duck	USA	Wang C, et al.(2002)	90.34	96.18	97.01	86.15
X12798	3021	domestic Duck	Gennany	Mattes, et al.(1990)	90.31	96.18	97.01	86.15
X74623	3021	domestic Duck	Lndia	GenBank	89.85	94.27	97.01	84.50
AF047045	3021	domestic Duck	Canada	GenBank	90.38	95.80	97.01	86.02
AY250904	3021	Pekin Duck	SouthAfrican	Mangisa,N.P.etal.(2004)	90.24	95.80	97.01	85.77

为进一步了解本研究克隆的 DHBV 与各基因型之间的差异,将本研究克隆的 DHBV 编码 P、S、C 蛋白的氨基酸与 17 株分离株对应的编码氨基酸进行同源性比较。结果表明,本研究克隆的 DHBV 的 C 蛋白及 S 蛋白与其它各分离株相似,均高度保守,其中 C 蛋白氨基酸同源性为 94.27%~98.85%, S 蛋白氨基酸同源性在 93.41%~98.20% 之间,而 P 蛋白则显示出较大异质性,其同源性介于 84.50%~90.72%(表 1),与中国基因型分离株和西方基因型分离株的平均同源性分别为 89.06% 和 85.85%。将编码 P 蛋白的氨基酸进一步比对分析发现,除 3 个结构功能区(N-末端蛋白,RT/DNA 聚合酶和 RNase H)序列高度保守外,本研究克隆的 DHBV 含有中国基因型分离株特有的标志性氨基酸(signature amino acid)^[4],与西方基因型分离株在该位点的氨基酸明显不同,同源性仍倾向于中国基因型。当然,也有少量例外,如在 P 蛋白 272 位氨基酸处 S 代替了 T,在 567 位氨基酸处 N 取代了 K(表 2)。

表 2 HB DHBV 分离株与其它基因型分离株编码 P 蛋白标志性氨基酸的比较

Table 2 Comparison of signature amino acid residues encoding P protein of DQ276978 isolate with those of other DHBV

ORF Region	Signature amino acid residue*	DQ 276978	Chinese isolates	Western isolates	Exceptions [#]
Polymerase	202	Y	Y	H	
	208	Q	Q	H	
	210	P	P	Y	
	223	E	E	T	
	231	A	A	V	
	237	P	P	K	
	244	C	C	V	
	272	S	T [#]	S	X58569[P]
	345	Q	Q	S	
	356	E	E	V	
	361	R	R	G	
	567	N	K [#]	N	X58568[R] X58569[R]
	637	A	A	S	
	695	I	E	V	
	701	V	V	S	
	270	T	T	P	

Note: *Signature amino acid residues encoding P protein of HB DHBV (DQ276978) isolate; [#]The alternative amino acid residue is shown in the square brackets

2.4 系统发育分析

用 CLUSTAL W 和 TreeView 软件对本研究克隆的 DQ276978 及 GenBank 中公布的 17 株 DHBV

全基因组进行进化树分析比较,结果也分为中国基因型和西方基因型,该分离株属于中国基因型中的一个亚型,它与中国基因型中的 X58569(上海株)同源性最高(图 1)。

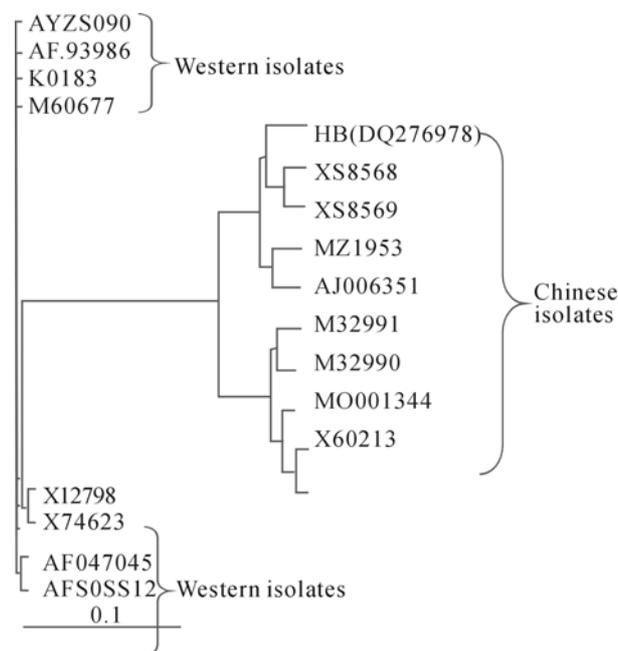


图 1 18 株 DHBV 全基因组进化树分析

Fig1. Phylogenetic tree of 18 DHBV genomes

3 讨论

嗜肝 DNA 病毒具有严格的种属特异性,HBV 只能感染高等灵长动物,如黑猩猩和长臂猿,这些动物价格昂贵且不易获得。鸭乙型肝炎病毒模型在研究嗜肝病毒生活周期和抗病毒策略等方面具有重要价值。

国外 DHBV 动物模型常选用 Pekin duck 作为实验鸭种,该鸭与湖北麻鸭均属鸟纲雁形目鸭科,其中 Pekin duck 的属种为 *Anas domesticus platyrhynchos*,而湖北麻鸭的属种是 *Tadorna tadorna*。湖北地区盛产麻鸭,其自然感染 DHBV 的调查结果表明:所检测的 70 只成年麻鸭的 DHBV 携带率为 10%,相对于国外 Pekin duck (携带率 1%-6%) 及野水鸭 (携带率 3-10%)^[5] 而言,湖北麻鸭对 DHBV 易感,自然携带率较高,是较为理想的实验鸭种。

本研究克隆的 DHBV 与 GenBank 公布的 17 株 DHBV 全基因组通过核苷酸的同源性比对、氨基酸同源性比较及系统发育进化树分析,表明本研究分离的湖北麻鸭株在进化关系上更接近于中国基因型的分离株,属于 DHBV 中国基因型中的一个亚

型, 显示出一定的地域相似性。

本研究克隆的 DHBV 分离株的 DNA 全长基因组有 3 个开放读码框(ORF): P、S 和 C, 它们分别编码聚合酶蛋白 P, pre-S 和 S 膜蛋白, C 蛋白和“e”抗原, 各基因组结构紧密, 在同一序列上有重叠的 ORF。DHBV 缺少哺乳动物嗜肝 DNA 病毒的 X 蛋白, 提示 HBX 并不参与基因组复制或毒粒装配机制。

DHBV DNA 的几个重要功能元件均高度保守。DR1(2538-2549nt)和 DR2(2480-2491nt)均含有一段 12nt 的一致性基因序列: TACACCCCTCTC, 该重复序列在保持染色体组环状结构和病毒与宿主染色体 DNA 整合中起重要作用。多聚腺苷酸区位于 2775-2780nt, 序列为 AATAAA, 它的主要功能在于终止 mRNA 的转录。C 基因启动子(CP)(2155-2533nt)内有 DR2 和增强子 Enh (2172-2351nt), 其中增强子含有可与多种核因子(C/EBP、HNF1、HNF3 及 GATA 家族因子)结合的保守序列。

蛋白质序列中也有一些重要的保守位点。P 蛋白中 RT 活性位点 YMDD 位于 P 蛋白的 512-515aa; P 蛋白的 N-末端蛋白内的第 96 位酪氨酸残基是 RNA 衣壳体信号序列(ε)的结合位点, 可引导 DNA 合成, 并使聚合酶与病毒 DNA 共价结合。PreC/C 蛋白的糖基化位点 NAS 位于 C 蛋白的 4-6aa; PreC 蛋白 C 末端加工信号序列 TTVVYGRRR 位于 221-229aa。S 蛋白中糖基化信号 NGS 出现在 99-101aa。

P-ORF 与 PreS/S-ORF 的重叠部位称为 P-ORF 的“Spacer”区, 该区无已知的功能, 只是将末端蛋白 TP 和其他分子连接起来, 但该部位是 DHBV 分离株碱基缺失、突变、替换的集中区域^[3], 这也造成各分离株间的 P 蛋白有较大的异质性; 另外, 与“Spacer”区重叠的 PreS 基因在病毒进入宿主细胞过程中起重要的连接作用^[6], 其高度变异可能会造成不同鸭种对不同基因型病毒存在着不同的耐受性或易感性^[7]。同样本研究克隆的 DHBV DNA 全长序列(3024bp)与国内外的一些分离株相差的 3 个碱基也出现在该区, 具体为: 比西方基因型的所有分离株(全长均为 3021bp)多出的 3 个碱基位于 P 蛋白“Spacer”区的 356aa^[8-10]; 相比中国基因型的部分分离株 M32990、M32991、NC001344、X60213 和 AJ006350(全长均为 3027bp), DQ276978 缺失的 3 个碱基位于 P 蛋白“Spacer”区的 371aa 或 373aa^[3,11]。

DHBV 先天性感染后, 感染呈慢性, 病毒复制

长期持续存在。由于鸭体内产生免疫耐受, DHBV 无需为逃避免疫压力而发生较多的序列突变, 因而两种基因型间差异相对于 HBV 的 9 种基因型间差别^[12]是较低的。对 DHBV 基因亚型的分析表明, 中国基因型分离株的亚型间差别(6.06%)明显高于西方基因型(0.92%), 这可能与各基因亚型分离株前基因组(PgRNA)的区的二级结构有关。PgRNA 上的序列是病毒反转录的包装信号, 该序列位于 2563-2619nt, 区形成为有一突起序列 CUUUAC 和攀顶 UGUU 的干-攀结构, 其突起部高度保守, 可能含有便于 P 蛋白识别的重要元件^[13]; 在 P 蛋白与该结构特异性结合后, 可从突起部位合成 GTAA, 然后转位到 DR1 的相应部位, 继续合成负链 DNA^[14]。用 RNA Structure Version 4.2 软件^[15]分析

区的二级结构, 结果表明: 西方基因型的所有分离株区的 RNA 折叠只有一种相同的结构, 而中国基因型的分离株区的 RNA 折叠则有许多不同的构成(图 4)。这主要是由于西方基因型的所有分离株区的核苷酸序列十分保守, 而中国基因型的分离株区的 2598-2602nt 有多个变异, 这些变异直接影响了区 RNA 的空间折叠构像, 亦可能在复制过程中影响负链合成起始的精确位点^[16], 从而造成中国基因型各亚型间较大的差别。

References

- [1] Duflo A, Mehrotra R, Yu S Z, *et al.* Spectrum of liver disease and duck hepatitis B virus infection in a large series of Chinese ducks with hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 1995, 21 (6): 1483-1491.
- [2] Gunther S, Li B C, Miska S, *et al.* A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients [J]. *J Virol*, 1995, 69: 5437-5444.
- [3] Triyatni M, Ey P, Tran T, *et al.* Sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82 (pt2): 373-378.
- [4] Mangisa N P, Smuts H E, Kramvis A, *et al.* Molecular characterization of duck hepatitis B virus isolates from South African ducks [J]. *Virus Genes*, 2004, 28 (2): 179-186.
- [5] Cova L, Lambert V, Chevallier A, *et al.* Evidence for the presence of duck hepatitis B virus in wild migrating ducks [J]. *J Gen Virol*, 1986, 67: 537.
- [6] Li J S, Tong S P, Wands J R. Characterization of a 120-Kilodalton pre-S-binding protein as a candidate duck hepatitis B virus receptor [J]. *J Virol*, 1996, 70: 6029-6035.

- [7] Guo H, Mason W S, Aldrich C E, *et al.* Identification and characterization of avihepadnaviruses isolated from exotic anseriformes maintained in captivity [J]. *J Virol*, 2005, 79 (5): 2729-2742.
- [8] Mandart E, Kay A, Galibert F. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences [J]. *J Virol*, 1984, 49 (3) :782-792.
- [9] Molnar-Kimber K L, Summers J W, Mason W S. Mapping of the cohesive overlap of duck hepatitis B virus DNA and of the site of initiation of reverse transcription [J]. *J Virol*, 1984, 51 (1): 181 - 191.
- [10] Mattes F, Tong S, Teubner K, *et al.* Complete nucleotide sequence of a German duck hepatitis B virus [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18 (20): 6140.
- [11] Uchida M, Esumi M, Shikata T. Molecular cloning and sequence analysis of duck hepatitis B virus genomes of a new variant isolated from Shanghai ducks [J]. *Virology*, 1989, 173 (2): 600- 606.
- [12] Morozov V, Pisareva M, Groudinin M. Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus [J]. *Gene*, 2000, 30; 260 (1-2): 55-65.
- [13] Beck J , Nassal M. A sensitive procedure for mapping the boundaries of RNA elements binding in vitro translated proteins defines a minimal hepatitis B virus encapsidation signal [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 4364-4366.
- [14] Tang H, McLachlan A. A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency [J]. *Virology*, 2002; 303: 199-210.
- [15] Zuker M. M fold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction [J]. *Nucleic Acids Res*. 2003, 31 (13): 3406-3415.
- [16] Tavis J E, Ganem D. RNA sequences controlling the initiation and transfer of duck hepatitis B virus minus-strand DNA [J]. *J Virol*, 1995, 69: 4283-4291.