

利用重叠延伸 PCR 快速构建中国株乙型肝炎病毒的感染性克隆*

孙伟^{1**}, 鲍静^{1***}, 陆仁飞², 杨帆³, 张娜³, 朱丹丹¹, 段义农^{1***}

(¹南通大学医学院病原生物学系, 南通 226001; ²南通市第三人民医院检验科; ³南通大学公共卫生学院)

[摘要] 目的: 体外扩增中国株乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的基因组全长序列, 快速构建中国株 HBV 感染性克隆, 建立中国株 HBV 体外复制细胞模型。方法: 设计保守引物, 扩增 HBV 全长基因组序列。对扩增到的 HBV 基因组进行 DNA 测序及计算机辅助分析, 确定病毒的基因型。通过重叠延伸 PCR(splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR)技术, 构建 1.3 倍基因组长度的 HBV 感染性克隆质粒 pHBV1.3。将 pHBV1.3 质粒转染人肝癌细胞系 HepG2, 采用 Western Blot、酶联免疫吸附试验及 Real-PCR 检测病毒复制及表达情况。检测该感染性克隆对临床抗病毒药物阿德福韦的敏感性。结果: 成功扩增到 1 株 C 基因型 HBV 全长基因组, 其 GenBank 登陆号为 KF495606。构建了中国株 HBV 感染性克隆 pHBV1.3(C)质粒, 该质粒能在肝癌细胞株中进行有效的复制、转录和表达。阿德福韦能在体外抑制该 HBV 感染性克隆的复制, 抑制程度依赖于药物浓度。结论: 利用 SOE-PCR 可快速构建 HBV 感染性克隆, 所构建的感染性克隆能介导高水平病毒复制, 可用于 HBV 复制机制和抗病毒等方面的研究。

[关键词] 乙型肝炎病毒; C 基因型; 感染性克隆; 复制; 表达

[中图分类号] R373.2, Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1674-7887(2013)06-0461-06

Rapid construction of an infectious replicon of hepatitis B virus (China isolate) via splicing by overlap extension PCR*

SUN Wei^{1**}, BAO Jing^{1**}, LU Renfei², YANG Fan³, ZHANG Na³, ZHU Dandan¹, DUAN Yinong^{1***} (¹Department of Pathogen Biology, Medical School, Nantong University, Nantong 226001; ²Clinical Laboratory, the Third People's Hospital; ³School of Public Health, Nantong University)

[Abstract] *Objective:* To clone the full-length genome of hepatitis B virus(HBV) (China isolate), construct HBV infectious replicon, and consequently establish cell model for HBV replication in vitro. *Methods:* Using conserved primers, the full-length genome of HBV was cloned from clinical serum sample. Then, 1.3-fold overlength genome of HBV, from the obtained HBV genome, was constructed by splicing of overlap extension PCR(SOE-PCR) and then cloned into pBluescript KS(+) to generate recombinant plasmid of pHBV1.3. The recombinant plasmids of pHBV1.3 were further transfected into HepG2 cell line. ELISA were performed to detect the levels of HBsAg and HBeAg in supernatant of HepG2 cells, Western Blot was utilized to reveal the level of intracellular HBsAg and HBeAg, and real-time PCR was used to analyze the titer of HBV DNA in supernatant. Antiviral effect of adefovir was evaluated in pHBV1.3(C) transfected HepG2 cells. *Results:* The full-length genome of HBV (China isolate) was successfully cloned from clinical serum sample, and DNA sequencing result revealed that the genotype of the obtained HBV(GenBank accession No. KF495606) belongs to C type. The recombinant plasmid of HBV infectious replicon was constructed from cloned HBV genome and named pHBV1.3(C). HBV gene carried in pHBV1.3(C) could efficiently replicate and express in HepG2 cells. Adefovir could inhibit HBV replication in this HBV cell model and the inhibition effect depended on the concentration of drug. *Conclusion:* The infectious replicon of HBV could be rapidly constructed by SOE-PCR, the obtained HBV construct could initiate viral replication efficiently in pHBV1.3(C) transfected hepatoma cells, which provide a useful in vitro cell model for HBV research.

[Key words] hepatitis B virus; C genotype; infectious replicon; replication; expression

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世 之多, 每年导致约 100 万人死亡, 严重影响了人类的 健康。研究 HBV 的困难之一是缺乏很好的体内感染 界范围广泛流行, 仅慢性 HBV 携带者就有近 4 亿人

* [基金项目] 江苏省高校自然科学基金资助项目(11KJB310008), 南通市科技计划项目(K2010035), 南通大学自然科学基金预研项目(10ZY009), 南通大学大学生创新训练计划项目

** [作者简介] 孙伟, 男, 汉族, 生于 1977 年 5 月, 重庆市忠县人, 博士, 研究方向: 病毒及分子生物学。

鲍静, 女, 汉族, 生于 1985 年 11 月, 江苏省无锡市人, 硕士, 研究方向: 医学病毒学。* 鲍静, 为共同第一作者。

*** [通信作者] 段义农, 电话: 0513-85051738, E-mail: ynduan@ntu.edu.cn

的动物模型和体外感染的细胞模型。最近,我国学者^[1]在 HBV 的研究中取得突破性的进展,揭示了 HBV 的受体为钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide NTCP),并在体外建立了 NTCP 稳定转染的肝癌细胞株。虽然 HBV 在体外能够感染 NTCP 转基因肝癌细胞株,但是其感染率很低,而且病毒进入细胞后的复制水平也很低^[1]。因此,目前对 HBV 感染的研究主要以稳定表达 HBV 的 HepG2.2.15 细胞系及其相应病毒 DNA 的感染性克隆为模型。该株 HBV 病毒的基因型为 D 型,血清型为 ayw,而中国 HBV 感染人群主要的基因型为 B 型和 C 型。HBV 基因型是影响 HBV 感染者预后的重要因素之一^[2-4],不同基因型、甚至同一基因型的不同亚型在毒力和临床表现上也有区别,是影响病情进展、预后及对治疗反应的重要因素。因此,建立中国株 HBV 的体外细胞模型显得十分迫切与必要。

研究^[5]证实,HBV 的 1.1、1.2、1.3 倍体都能在人类的肝癌细胞中完成一些相关蛋白的表达和病毒 DNA 的复制过程,但是 1.3 倍体 HBV 却是病毒复制水平最高,约为 HBV1.1、HBV1.2 的 10~100 倍,与 HBV 慢性感染者体内的病毒水平相近,能够在细胞上清中检测到 HBsAg 和 HBeAg,且可包装成新的病毒颗粒。在分子生物学方面看,1.3 倍体 HBV 之所以能够完成接近于体内的生活过程,是因为其下游连接了直至 polyA 的序列,上游端连接了直至 X 启动子和增强子的一段序列,而 5' 端的该段序列表达的 X 蛋白与 HBV 复制和转录激活密切相关^[6-7]。虽然其在病毒的生活周期中的具体作用还不是很清楚,但是可以确定的是,一个缺乏该序列的 HBV 是不会在体内起始感染的。那么,为了使 HBV 的基因组在体外也具有相同的感染性,我们就必须将一些相关的序列连接在一起,形成线性的 1.3 倍体 HBV。在本研究中,我们将从南通地区 HBV 感染者血清标本中克隆完整的病毒基因组,利用重叠延伸 PCR 技术(splicing by overlap extension PCR, SOE PCR)技术构建中国株 HBV 的感染性克隆,并在体外验证其对临床抗病毒药物的敏感性。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2 用含 10%胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司)、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞株购自中国典

型培养物保藏中心(CCTCC)。

1.2 HBV 基因组 DNA 的提取 乙肝患者血清样本均来源于南通市第三人民医院检验科,样本中 HBV 的 DNA 载量在 10⁵~10⁷ copies/mL 之间。取 200 μL 患者血清样本,利用一管式病毒 DNAout 试剂盒(北京天恩泽生物技术有限公司)提取 HBV 基因组 DNA,具体操作详见产品说明。提取得到的每份 HBV 的 DNA 分别用 100 μL 无菌水溶解,置于 -20 °C 冻存备用。

1.3 HBV 全长基因组的克隆 根据文献^[8]报道,以 HBV 负链开口处序列为起始点设计保守引物 Clone-F&R(表 1),引物由上海生工生物工程公司合成。以提取的 HBV 基因组 DNA 为模板,采用高保真性聚合酶 KOD plus(Toyobo 公司)进行 PCR 扩增,接着使用普通 Taq DNA 聚合酶(Fermentas 公司)对 PCR 产物进行 3' 末端加 A 尾处理。琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,切下目的条带,利用 DNA 胶回收试剂盒(Fermentas 公司)回收 PCR 产物。将纯化后的目的片段与 T 载体(TaKaRa 公司)连接,然后转化大肠杆菌感受态细胞,涂布 LB 固体平板(含 100 μg/mL 氨苄青霉素)。挑取单菌落,进行 PCR 检测,阳性菌落送交上海生工生物工程公司测序。对测序结果进行计算机辅助分析,并把完整的 HBV 序列递交到 GenBank。

1.4 利用 SOE-PCR 构建 1.3 倍体 HBV HBV 的基因组呈环状,其核苷酸编码的 1 号位点是 HBV 基因组序列中的 EcoR 酶切位点。我们克隆得到 HBV 基因组序列的位点为 1823-3197/1-1822,长度为 3 197 bp,要构建的 1.3 倍体 HBV 的核苷酸序列为 1050-3197/1-1990,长度为 4.2 kb。3 轮 PCR 反应如图 1 所示。首先,第 1 轮常规 PCR 反应以扩增得到的 HBV 基因组为模板,分别利用 4 对引物 HBV-F1&R1、HBV-F2&R2、HBV-F3&R3 和 HBV-F4&R4(表 1)扩增得到 1、2、3、4 个片段,然后第 2 轮 PCR 利用 2 对引物 HBV-F1&R2 和 HBV-F3&R4,分别以第 1 轮 PCR 的产物 1&2、3&4 为模板,通过 SOE-PCR 拼接得到 A、B 两个大片段;第 3 轮 PCR 则利用 1 对非特异性引物 HBV-F5&R5(表 1),以第 2 轮 PCR 的产物 A、B 片段为模板,通过 SOE-PCR 拼接得到 1.3 倍体 HBV。得到的 1.3 倍体 HBV 产物和空载体 pBluescript KS(+)分别经 EcoR 和 Sal 双酶切后进行连接生成重组质粒 pHBV1.3,转化大肠杆菌感受态细胞,涂布 LB 平板(含 100 μg/mL 氨苄青霉素)。挑取单克隆细菌,使用检测引物 HBV-F6&R6(表 1)进行菌落 PCR 检测。提取重组质粒

表 1 引物序列及用途

名称	序列	用途
Clone-F	5'-TTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3'	HBV 克隆上游引物
Clone-R	5'-AAAAAAGTTGCATGGTGCTGG-3'	HBV 克隆下游引物
HBV-F1	5'-TCTTGCTACACTGAATTCAATGTGGCTATCCTG-3'	片段 1 上游引物
HBV-R1	5'-TTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGCATGGTG-3'	片段 1 下游引物
HBV-F2	5'-ACCATGCAACTTTTTACCTCTGCC-3'	片段 2 上游引物
HBV-R2	5'-AATGTTGTGGAGTTCCTACTGCATGGCCTGAGGAT-3'	片段 2 下游引物
HBV-F3	5'-ATCCTCAGGCCATGCAGTGGAACTCCACAACATT-3'	片段 3 上游引物
HBV-R3	5'-GTTGCATGGTGCTGGTG-3'	片段 3 下游引物
HBV-F4	5'-CCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG-3'	片段 4 上游引物
HBV-R4	5'-AATTATTACTCCTGGTCCAGAGGCGGTGTCGA-3'	片段 4 下游引物
HBV-F5	5'-TCTTGCTACACT-3'	上游非特异性引物
HBV-R5	5'-AATTATTACTCCTG-3'	下游非特异性引物
HBV-F6	5'-GAGCCAACTCAAACAATCC-3'	上游鉴定引物
HBV-R6	5'-CCACTGAACAAATGGCACTA-3'	下游鉴定引物

注 HBV-F1 引物序列中斜体和下划线部分为酶切位点 EcoR *GAATTC* ;HBV-R4 引物序列中斜体和下划线部分为酶切位点 Sal *GTCGAC*。

pHBV1.3(C) ,进行 EcoR 和 Sal 双酶切鉴定及 DNA 测序验证。

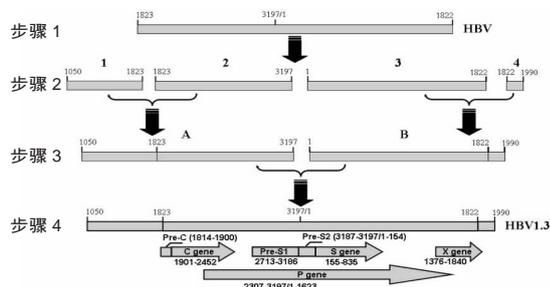


图 1 SOE-PCR 构建 1.3 倍体 HBV 的示意图

1.5 真核细胞转染 采用 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)进行真核细胞的转染。转染前 1 d ,接种 HepG2 细胞至 6 孔或 24 孔培养板 ,转染时细胞生长至孔底面积的 90%~95%。共转染 3 种不同的质粒 ,包括空载体对照(阴性对照)pBluescript KS(+),阳性对照 pHBV1.3(D)(由本实验室构建)^[9]和实验组 pHBV1.3(C) ,每种处理做 3 个复孔。转染后 6 h 更换培养液 ,48 h 后分别收取培养上清和细胞 ,通过酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay , ELISA)、Western Blot 和 Real-time PCR 检测病毒蛋白表达和病毒复制的水平。

1.6 ELISA 采用 ELISA 试剂盒(上海科华生物工程有限公司)检测转染后分泌到培养上清中的 HBeAg 和 HBsAg ,具体操作步骤按照产品说明书进行。最终用酶标仪读取 450 nm 波长(参考波长 630 nm)下的吸光度值(OD₄₅₀)。

1.7 Western Blot 收取转染后的 HepG2 细胞 ,加入细胞裂解液处理 10 min ,再加入 SDS-PAGE 上样缓冲液 ,沸水浴 10 min。将制备好的样品进行 SDS-PAGE ,电泳结束后将样品转移至 PVDF 膜。转膜结束后 ,用 TBST 溶解的 5%脱脂奶粉封闭 1 h ,一抗于 4 ℃孵育过夜 ,鼠抗-HBs 单克隆抗体 1:1 000 ,兔抗-HBc 多克隆抗体 1:4 000 ,兔抗-GAPDH 多克隆抗体 1:1 000 ,一抗均购自 Santa Cruz 公司。TBST 洗 3 次 ,每次 10 min。二抗室温孵育 1 h ,HRP 标记的羊抗-鼠 IgG 稀释浓度 1:5 000 ,HRP 标记的驴抗-兔 IgG 稀释浓度 1:5 000(Sigma 公司)。孵育结束后 TBST 洗 3 次 ,每次 10 min。用化学发光显色试剂盒 Immobilon Western(Millipore 公司)孵育 5 min ,于暗室中显影。

1.8 药物敏感性试验 感染性克隆 pHBV1.3(C)质粒转染 HepG2 细胞后 12 h ,换成含不同质量浓度(0.05 ,1 ,2 μg/mL)的临床药物阿德福韦酯(Adefovir)培养基 ,继续培养 36 h ,收取细胞培养基上清和细胞 ,分别检测病毒蛋白表达和病毒复制的水平。

2 结 果

2.1 中国株 HBV 基因组的克隆 收集 7 份 HBV 患者血清 ,提取其中的 HBV 基因组 DNA。设计保守引物 ,以提取的 HBV 基因组 DNA 为模板 ,采用高保真性聚合酶进行扩增。PCR 产物电泳结果显示 ,7 份血清样本除 1 号样本扩增产物较弱外 ,其余 6 份样本均有较明显的特异性扩增条带 ,其大小在 3 200 bp

左右处(图 2)。将产物与 pMD-18T 载体相连 转化大肠杆菌感受态细胞并涂布平板。PCR 检测细菌单克隆 将 15 个阳性克隆送交测序。DNA 测序结果显示 我们成功克隆到 1 株 HBV 的完整基因组 DNA , 其序列全长为 3 197 bp(GenBank ,KF495606)。计算机辅助分析表明 在南通地区克隆到的这株 HBV 的基因型为 C 型 基因组的各个基因区 C、X、P 和 S 区均完整无致死性突变, 适合用于进一步构建体外复制的细胞模型。

2.2 1.3 倍体 HBV 感染性克隆的构建 以克隆到的 C 基因型 HBV 基因组 DNA 为模板, 我们通过 SOE-PCR 构建 1.3 倍体 HBV 感染性克隆(图 1)。在第 1 轮 PCR 中 我们利用 4 对特异性引物 克隆到 4 个核苷酸片段 其大小与预期一致 分别为 774 bp、1 375 bp、1 822 bp 和 169 bp(图 3 A)。接着 我们以得到的 4 个片段为模板进行 SOE-PCR 并成功拼接得到 2 个大片段 其大小分别为 2 149 bp 和 1 991 bp (图 3 B)。以得到的 2 个大片段为模板, 继续进行 SOE-PCR 拼接 产物电泳结果显示在 4.2 kb 处有明

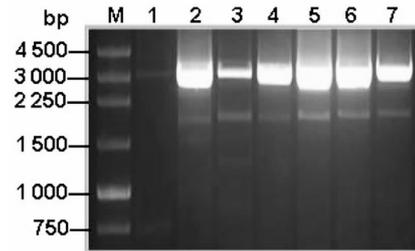
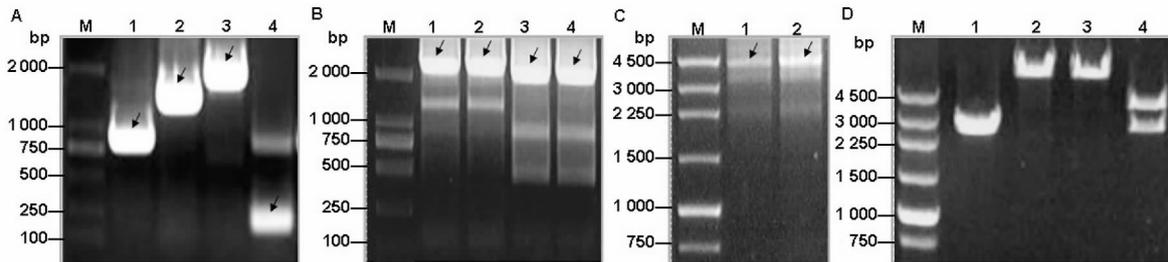


图 2 琼脂糖凝胶电泳检测 HBV 基因组 PCR 扩增产物

显的特异性条带(图 3 C) 表明 1.3 倍体 HBV 拼接成功。将 1.3 倍体 HBV 连接到 pBluescript KS (+)载体上 生成重组质粒 pHBV1.3(C)。酶切鉴定重组质粒 电泳结果显示在 1 号泳道中空载体线性大小为 3 kb , 2、3 泳道中 pHBV1.3(C)单酶切后大小为 7.2 kb , pHBV1.3(C)双酶切后形成 2 个大小不同的线性片段 较小的一个是载体片段 大小为 3 kb 较大的一个片段是 1.3 倍体 HBV ,大小为 4.2 kb(图 3D)。将pHBV1.3(C)送交测序 但是由于是 1.3 倍体基因组序列 存在 0.3 倍体的重复序列 因此测序时未能测通 从测得的部分序列比对分析 没有发现核苷酸突变位点。



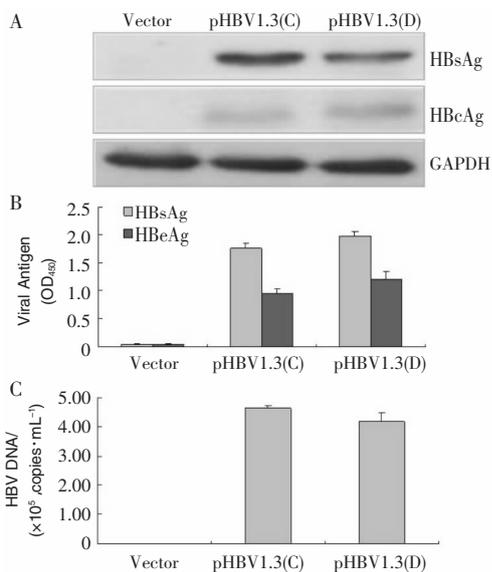
注 :A, PCR 扩增得到 1、2、3、4 个不同大小的特异性片段 ;B, SOE-PCR 拼接得到 2 个大片段, 1、2 泳道为上游片段, 3、4 泳道为下游片段 ;C, SOE-PCR 拼接得到 1.3 倍体 HBV, 1、2 泳道为同一产物 ;D, 酶切鉴定重组质粒 1, 空载体 pBluescript KS(+), 用 EcoR 单酶切, 2, pHBV1.3(C)用 EcoR 单酶切, 3, pHBV1.3(C)用 Sal 单酶切, 4, pHBV1.3(C)用 EcoR 和 Sal 双酶切。

图 3 SOE-PCR 构建 1.3 倍体 HBV 感染性克隆

2.3 HBV 感染性克隆的体外复制 为了验证所构建的 pHBV1.3(C)能否在体外培养肝细胞中进行复制 我们进行了转染实验。收取 pHBV1.3(C)转染后的 HepG2 细胞和培养上清 Western Blot 实验揭示 和阳性对照一样 在 pHBV1.3(C)转染的 HepG2 细胞中 HBV 的病毒蛋白 HBsAg 和 HBeAg 都有明显的表达条带, 阴性对照无特异性条带, 而内参蛋白 GAPDH 在 3 个处理中表达一致(图 4A)。同样 在培养上清中 实验组和阳性对照的上清中均能检测到明显的病毒蛋白 HBsAg 和 HBeAg 而阴性对照中没有明显的颜色反应(图 4B)。为了检测是否有成熟的 HBV 颗粒分泌到培养上清中 我们利用 Real-time PCR 检测了培养上清中的 HBV 的滴度 结果显示在实验组和阳性对照组中病毒的滴度均达到 10⁶ 拷贝/mL

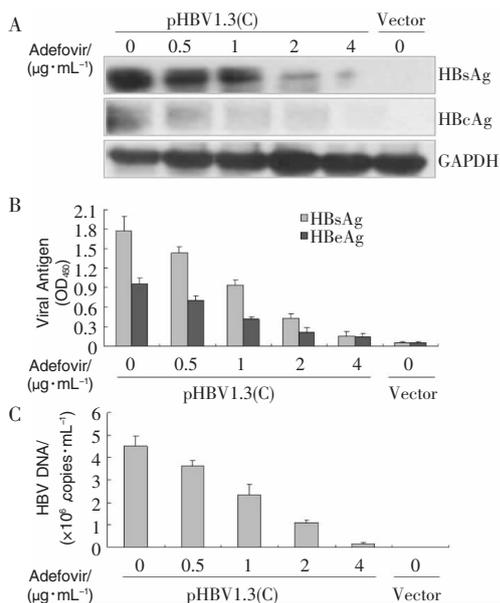
水平 而阴性对照中没有检测到阳性信号(图 4C)。因此 转染实验证实感染性克隆 pHBV1.3(C)能够在体外培养肝癌细胞中进行有效的转录和复制。

2.4 HBV 感染性克隆对药物的敏感性 为了检测所构建的 pHBV1.3(C)对药物的敏感性 我们将目前临床一线抗病毒治疗药物阿德福韦酯(Adefovir)加入到 pHBV1.3(C)转染的 HepG2 细胞中。如图 5 所示 在加入阿德福韦酯后 HBV 感染性克隆的复制和转录都受到抑制, 而且这种抑制作用随着阿德福韦酯浓度的升高而增加 即抑制作用呈剂量依赖性。在阿德福韦酯质量浓度增加到 4 μg/mL 时 在上清和裂解细胞中几乎检测不到病毒蛋白的表达(图 5A~B), 培养上清中的 HBV 滴度与对照相比亦下降了约 96%(图 5C)。药物敏感试验表明 我们所构建的中国



注:A, Western Blot 检测病毒蛋白 HBsAg 和 HBcAg 的表达; B, ELISA 检测培养上清中 HBsAg 和 HBcAg 的水平; C, Real-time PCR 检测培养上清中 HBV 的滴度。

图4 感染性克隆 pHBV1.3(C)在 HepG2 细胞中的复制



注:A, Western Blot 检测 pHBV1.3(C)转染的 HepG2 细胞中加入阿德福韦酯后病毒蛋白的表达; B, ELISA 检测 pHBV1.3(C)转染的 HepG2 细胞中加入阿德福韦酯后分泌到培养上清中的病毒蛋白水平; C, Real-time PCR 检测 pHBV1.3(C)转染的 HepG2 细胞中加入阿德福韦酯后分泌到培养上清中的病毒滴度。

图5 感染性克隆 pHBV1.3(C)对药物敏感性的检测

株HBV 感染性克隆 pHBV1.3(C)在体外培养肝癌细胞中对抗病毒药物敏感。

3 讨 论

以往构建 HBV 感染性克隆采用的方法一般都

是以 2 倍体 HBV 为起点,通过一系列酶切连接反应,拼接成 1.3 倍体 HBV^[10-11]。这种方法耗时相对较长,能够选择的酶切位点通常都是不常见的工具酶,酶切效率较低,而且由于受酶切位点限制,线性 1.3 倍体 HBV 的起止位点往往不够准确。SOE PCR 是利用两段末端具有互补序列的片段,通过互补重叠结合在一起,相互作为模板延伸合成核苷酸,从而将两段 DNA 序列连接在一起的技术^[12]。在本研究中,我们充分利用此技术,快速准确的构建成线性 1.3 倍体 HBV。因为我们所需的目的片段是一个特殊的 1.3 倍体,如果拼接位点选择不当就可能同一片段内部形成互补的环形分子或者首尾相连形成超大分子。实验中,我们曾选取 1 823 位点作为片段 2 的下游位点,但是 PCR 产物出现电泳时跑不出孔现象,后续实验证实其为片段 A 自身成环或首尾相连而成的大片段。为了解决这个问题,我们在选择片段 2 的下游位点时向前推移至 3 197 位点,这样不仅使引物设计不受错配的影响,而且也让后续的 A、B 片段大小相当,使搭桥延伸更有效。由于实验后期涉及的片段都相对较大,在这种情况下,我们就选择在引物 F1 和 R4 酶切位点的 5' 端加入一段非特异性序列,它不会与基因组中任何一段序列形成互补关系。这样在 1.3 倍体的拼接扩增时,就不会因为两端引物会与内部其它位点的错误配对而得不到目的核苷酸大片段。

本研究中我们从南通地区 HBV 患者血清中克隆得到一株完整的 HBV 基因组序列,计算机辅助分析显示其基因型为 C 型。后续的实验中,我们又克隆到 7 株完整的 HBV 基因组序列,其中 5 株为 C 基因型,2 株为 B 基因型,表明南通地区 HBV 基因型可能以 C 型为主,这和此前的流行病学调查是一致的^[4]。我们以克隆到的单倍体线性 HBV 基因组为基础,通过 SOE-PCR 快速拼接形成了 1.3 倍体 HBV 线性序列。1.3 倍 HBV 基因组是完整的病毒复制体,包含了 5' 末端重复 Enh₁、Enh₂、复制起始区(直接重复序列 DR1 和 DR2)、前基因组转录起始位点、X 和前 C 区启动子、X 开放读码框等,可产生 3.5 kb、2.4 kb、2.1 kb 和 0.8 kb 等所有 HBV 特异转录子^[13-15]。在 1.3 倍体 HBV 载体的选择方面,利用常见真核表达载体(如 pCDNA3.1)构建的感染性克隆在转录过程中会转录一个长度大于 pgRNA 的 mRNA,这个 mRNA 对病毒抗原的产生是否有影响也是一个值得探讨的问题^[16]。因此,我们选用了克隆载体 pBlue-script KS(+),该载体无外源启动子,可以避免真核表

达载体(如 pCDNA3.1)中异源启动子(如 CMV 启动子)对 HBV 复制和转录的干扰,从而影响我们对 HBV 感染性克隆在体外真实的复制和表达情况的研究分析。

总之,在本研究中我们成功克隆到 1 株 C 基因型 HBV 基因组全长序列,构建了中国株 C 基因型 HBV1.3 倍基因组克隆。通过 ELISA、Western Blot 和 real-time PCR 等方法,从蛋白表达和 DNA 复制等方面对感染性克隆进行了验证,结果显示新构建的中国株 C 基因型 HBV 感染性克隆具有完整的复制能力。而且,该感染性克隆对临床治疗药物阿德福韦酯呈剂量依赖性敏感,因此可作为抗病毒药物研发的一个体外研究细胞模型。

[参考文献]

- [1] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate co-transporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus[J]. *Elife*, 2012, 1:e00049.
- [2] Yaginuma K, Shirakata Y, Kobayashi M, et al. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(9):2678-2682.
- [3] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(4):1005-1009.
- [4] 刘兴,唐红,何芳.乙型肝炎病毒基因型研究新进展[J].*世界华人消化杂志*, 2006, 14(22):2211-2216.
- [5] Ren S, Nassal M. Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors[J]. *J Virol*, 2001, 75(3):1104-1116.
- [6] Gilbert S, Galarneau L, Lamontagne A, et al. The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1[J]. *J Virol*, 2000, 74(11):5032-5039.
- [7] Heipertz RA, Miller TG, Kelley CM, et al. In vitro study of the effects of precore and lamivudine-resistant mutations on hepatitis B virus replication[J]. *J Virol*, 2007, 81(7):3068-3076.
- [8] Günther S, Li BC, 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(9):5437-5444.
- [9] Yue X, Wang H, Zhao F, et al. Hepatitis B virus-induced calreticulin protein is involved in IFN resistance[J]. *J Immunol*, 2012, 189(1):279-286.
- [10] 卢银平,董继华,刘朝,等.乙型肝炎病毒感染性复制子构建及其意义[J].*中国公共卫生*, 2008, 24(6):687-689.
- [11] Delaney WE 4th, Isom HC. Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus[J]. *Hepatology*, 1998, 28(4):1134-1146.
- [12] Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(7):e59.
- [13] Doitsh G, Shaul Y. Enhancer I predominance in hepatitis B virus gene expression[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(4):1799-1808.
- [14] Honigwachs J, Faktor O, Dikstein R, et al. Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer[J]. *J Virol*, 1989, 63(2):919-924.
- [15] Antonucci TK, Rutter WJ. Hepatitis B virus(HBV) promoters are regulated by the HBV enhancer in a tissue-specific manner[J]. *J Virol*, 1989, 63(2):579-583.
- [16] Hu JL, Cui J, Deng XY, et al. A new strategy for constructing in vitro replication-competent 1.3 copies of hepatitis B virus genome[J]. *J Virol Methods*, 2009, 161(1):63-69.

[收稿日期] 2013-08-26