

技术方法

DOI: 10.11699/cyxh20130420

低拷贝 HBV 病毒全长 DNA 的制备和体外复制水平的鉴定

杜 茜, 马其欢, 龚旭阳, 蔡雪飞

(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:从乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)低拷贝的血清样本中提取病毒 DNA 并通过 PCR 扩增得到全长 DNA 片段。将全长片段经过环化处理后转染 HuH7 细胞, 体外评价病毒的复制水平。**方法:**设计含有 *BspQ I* 酶切位点的 HBV 全长扩增引物和分段扩增引物, 选择 HBV 低拷贝的临床病人血清样本, 经抽提纯化后的病毒 DNA 作为模板, 用巢式 PCR 结合分段扩增的方法扩增得到 HBV 全长 DNA, PCR 产物经 *BspQ I* 酶切后自连环化, 将环化的 HBV DNA 转染 HuH 7 细胞, 经 5 d 细胞培养, 提取细胞中的病毒复制中间体, 通过 Southern blot 分析病毒复制水平。**结果:**通过 PCR 扩增得到 5 个 HBV 全长 DNA, 经过酶切连接全长基因后转染 HuH7 细胞, Southern blot 检测均有复制表达。**结论:**本实验成功构建能够有复制表达的 HBV 环化全长, 为研究血清中低拷贝 HBV 病毒的不同病人复制水平与 DNA 序列关系打下基础。

【关键词】低拷贝; 乙肝病毒; 全长扩增; 闭合环状 DNA

【中国图书分类法分类号】R575

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-08-09

Low copy number amplification of full-length hepatitis B virus gene and identification of in-vitro replication level in serum

DU Xi, MA Qihuan, GONG Xuyang, CAI Xuefei

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

【Abstract】Objective: To evaluate the replication of virus by extracting virus DNA from low copy number of hepatitis B virus (HBV) serum samples, doing PCR amplification to acquire full-length HBV DNA fragments and transfecting HuH7 cells with full-length HBV DNA fragments after treatment. **Methods:** Primers for fragment and full-length amplification containing *BspQ I* restrictive enzyme cutting site were designed and HBV DNA from patients was used as templates. Full-length HBV was acquired by nested PCR combined with sectional amplification. Closed circular DNA was got through restrictive enzyme digestion and T4 DNA ligase ligation. HBV replication level was analyzed by Southern blot after HuH 7 cells being transfected with closed circular HBV DNA. **Results:** Five complete HBV genomes were successfully obtained using the new PCR method. After digestion, ligation and transfection experiments, Southern blot results all supported replication expression. **Conclusions:** This method lays a foundation for investigating the correlation of different HBV replication levels and DNA variation in patients with low copy number of virus.

【Key words】 low copy number; hepatitis B virus; full-length replication; closed circular DNA

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种 DNA 病毒, 属于嗜肝 DNA 病毒科。DNA 呈双链环状并且有缺口, 含有约 3 200 bp。DNA 双链长短不一, 长度恒定的长链为负链, 正链长度可变, 约为长链的 50%~80%。病毒进入细胞脱去病毒蛋白, HBV DNA 在细胞浆中成为松弛环状 DNA, 当正链延长, 各链缺口闭合合成共价闭合环状(covalently closed circular DNA, cccDNA), cccDNA 是病毒转录的模板, HBV DNA 复制周期开始于 cccDNA 转录前基因组 RNA^[1]。因此 cccDNA 在 HBV 的复制与转录中起着

关键的作用。本实验通过 PCR 扩增、酶切、连接得到环化的全长 HBV, 这种环化的 HBV DNA 相当于 cccDNA, 将其转染 HuH7 细胞, 检测病毒复制表达结果。这种方法有利于研究分析不同病人病毒 DNA 的复制水平与 DNA 序列的关系。由于 HBV DNA 结构有缺口, PCR 扩增 HBV 全长有困难, 1995 年 Gunther 等^[2-3]设计针对负链缺口区的引物, 避免延伸跨越缺口区, 一步法扩增出了 HBV 全长基因。但是一步法灵敏度不高, 对于拷贝数低的样本无法实现全长扩增, 本实验中通过巢氏扩增 HBV 片段, 片段融合扩增最终得到 HBV 全长, 实验证明此方法可有效从低拷贝样本中扩增得到 HBV 全长, 为后续的 HBV 环化、转染细胞实验打下基础。

作者介绍: 杜 茜, Email: duxi0504@163.com,

研究方向: HBV 临床病理分子机制研究。

通信作者: 蔡雪飞, Email: caixuefei@cqu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒及样本 HuH7 细胞系由本实验室保存提供,HBV B 型全长 1.3 倍体阳性对照质粒 pcDNA1.3 由本实验室构建并保存。5 例 HBV 小三阳患者血清(病毒拷贝量 $<1.0 \times 10^5$ IU/ml)收集于重庆医科大学附属儿童医院检验科。

1.1.2 试剂 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒,胶回收/PCR 纯化试剂盒购自北京天根生物公司。DNA 聚合酶,加 A 反应试剂盒(DNA A-Tailing Kit),T 载体连接试剂盒购自 TaKaRa 公司。小量质粒提取试剂盒购自 Promega 公司。*BspQ I* 限制性内切酶和 T4DNA 连接酶购自 NEB 公司。MEM 细胞培养试剂购自 Invitrogen 公司,细胞转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 购自 Roche 公司,乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司,DIG High Prime Labeling DNA and Detection Starter Kit II 试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 将 HBV 全基因组分为 2 段,分别设计巢氏扩增引物扩增片段 I 和片段 II。片段 I 扩增引物为 F1823-R723 和 F1852-R705,片段 II 扩增引物为 F381-R1825 和 F465-R1770^[4],全长扩增引物为 QF 和 QR^[5]。引物序列见表 1,所用引物由上海英骏生物有限公司合成。

表 1 HBV 分段及全长扩增的引物
Tab.1 PCR primers of HBV fragment and full-length amplification

F1823	5' -TTATGCTCTTCTTTTTCACCTCTGCCTARTCATC-3'
R723	5' -ACAGTGGGGAAAGC-3'
F381	5' -GTCTGCGGCGTTTATC-3'
R1825	5' -TCATGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGCTG-3'
F1852	5' -ATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAG-3'
R705	5' -AGAAACGGRCTGAGGC-3'
F465	5' -TGCCCGTTTGTCTCTA-3'
R1770	5' -CAAAATCATTAACCTAATCTCCTCCC-3'
QF	5' -CCGGAAAGCTTATGCTCTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCATGTTTCATGCTCTACTGTTCAAGCCTCCAA G-3'
QR	5' -CCGGAGAGCTCATGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGTAACACACCAATTATGCCTACAGCCTCCGAG TACAAAGATCATTAACCTAATC-3'

1.2.2 乙肝病毒 DNA 提取及保存 取新鲜 HBV 阳性患者血清 200 μ l,根据病毒 DNA 提取试剂盒操作要求提取 HBV 病毒 DNA,最后溶解 50 μ l 体积,为了防止反复冻融,分装为 15、15、20 μ l 共 3 管,置于-80 $^{\circ}$ C 保存。5 个样本编号 1~5。

1.2.3 PCR 扩增 HBV 全长 DNA

1.2.3.1 第 1 轮扩增 以 1~5 号病毒 DNA 为模板,10 $\times$ LA 缓冲液 2 μ l,2.5 mmol/L each 的 dNTP Mix 3 μ l,25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 2 μ l,LA *Taq* 0.25 μ l,引物(10 pmol/ μ l)F1823、R723、F381、R1825 各 0.8 μ l,DNA 模板 5 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变

性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;退火温度设置温度降落 PCR 55 $^{\circ}$ C ~50 $^{\circ}$ C,-1 $^{\circ}$ C/循环,5 个循环降为 50 $^{\circ}$ C 后不变,30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸, I 片段延伸 2 min 30 s, II 片段延伸 2 min;共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.3.2 第 2 轮扩增 取第 1 轮 PCR 产物 2 μ l 为模板,引物 F1852、R705、F465、R1770 各 0.8 μ l,其他反应体系与反应条件同第 1 轮。

1.2.3.3 第 3 轮扩增(融合扩增) 将 PCR 扩增得到的片段 I 和片段 II 进行 1%的琼脂糖凝胶电泳,目的条带切胶回收纯化后测定 DNA 浓度,片段 I 与片段 II 按摩尔比 1:1 进行 PCR 融合扩增。反应体系同前,此步片段 I、片段 II 互为引物反应,反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;60 $^{\circ}$ C 退火 2 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;共 10 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.3.4 第 4 轮扩增(HBV 全长扩增) 取融合扩增 PCR 产物 2 μ l 为模板,引物 QF、QR 各 0.8 μ l,其余反应体系同前,反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;55 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min 20 s;共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。

1.2.4 HBV DNA 全长环化 PCR 全长扩增得到的产物凝胶电泳并胶回收。根据加 A 反应试剂盒和 T 载体连接试剂盒提供连接体系说明,将 HBV 全长 DNA 克隆到 PMD 19-T vector 载体后送华大基因测序鉴定,-80 $^{\circ}$ C 保存阳性质粒。按照 Qin 等^[5]的方法,以阳性质粒为模板,PCR 扩增得到 HBV 全长 DNA,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后胶回收,用限制性内切酶 *BspQ I* 对回收片段进行酶切并纯化酶切产物,然后通过 T4DNA 连接酶进行过 16 $^{\circ}$ C 过夜连接,连接产物即为环化 HBV DNA。连接产物用 PCR 纯化试剂盒进行纯化,纯化后产物备用转染 HuH7 细胞。

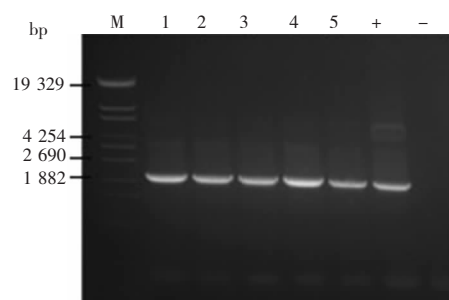
1.2.5 环化的 HBV DNA 在 HuH7 中复制水平的检测 转染前 1 d 将 HuH7 细胞接种到 6 孔板,每孔细胞数量为 1.0×10^5 个,每孔加入 2.5 ml MEM 细胞培养液,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,过夜培养约 16~24 h。按细胞转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转染 HuH7 细胞株的使用说明(Roche 公司网站下载)操作,每孔细胞转染 1.5 μ g 自连环化的 HBV DNA,连续培养 5 d 后,分别收集细胞和细胞上清。6 孔板中的细胞经 PBS 洗涤 2 次后,每孔直接滴加 200 μ l 的 NP-40 细胞裂解液,冰上放置 15 min 后将裂解液转移至 1.5 ml EP 管,按照 Garcia 等的方法^[6],提取细胞内 HBV 病毒复制中间体 DNA。以 HBV B 型 1.3 倍体质粒为模板,按照 DIG High Prime Labeling DNA and Detection Starter Kit II 试剂盒说明书进行 HBV 探针制备和灵敏度检测,将制备好的 HBV 探针和细胞内 HBV 病毒复制中间体 DNA,按试剂盒说明书方法进行 Southern blot,检测细胞内 HBV 病毒复制水平。细胞上清用于 ELISA 检测 HBeAg 和 HBsAg 表达水平。

2 结果

2.1 HBV 基因全长扩增及 T-A 克隆

片段 I、片段 II 的 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析,分别可见约 2 000 bp 和 1 300 bp 大小的特异性条带。电泳结果见图 1 和图 2。片段融合扩增 HBV 全基因组 PCR 产物为

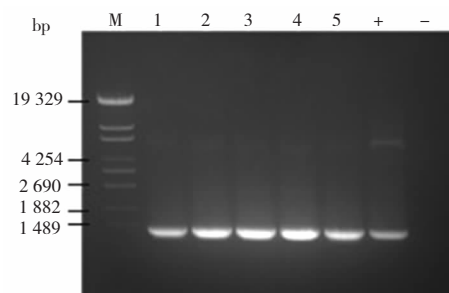
约 3 200 bp 的特异性条带,电泳结果见图 3。5 个全长 T~A 克隆测序结果显示插入序列正确。



M. λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1~5. 血清样本 1~5 号 PCR 扩增片段 I 的结果; +. 阳性对照; -. 阴性对照

图 1 HBV 分段扩增 PCR 产物片段 I 电泳图

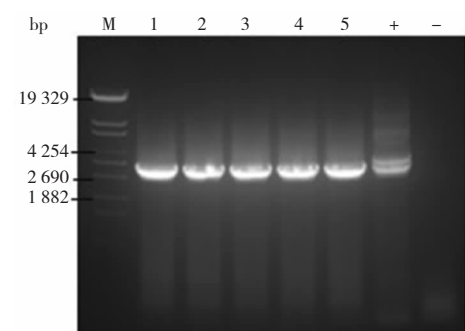
Fig.1 Electrophoretogram of PCR product of fragment I in HBV gene



M. λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1~5. 血清样本 1~5 号 PCR 扩增片段 II 的结果; +. 阳性对照; -. 阴性对照

图 2 HBV 分段扩增 PCR 产物片段 II 电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of PCR product of fragment II in HBV gene



M. λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1~5. HBV 全基因组扩增结果; +. 阳性对照; -. 阴性对照

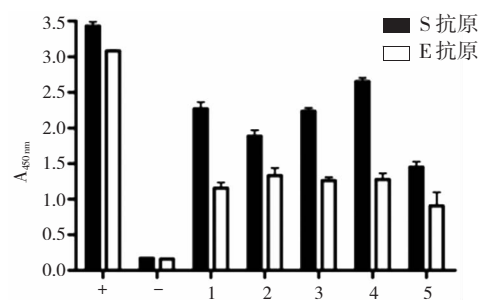
图 3 HBV 全基因组扩增 PCR 产物电泳图

Fig.3 Electrophoretogram of PCR product of full length HBV gene

2.2 环化的 HBV 全长支持 HBV 体外复制

将环化的 HBV 全长转染 HuH7 细胞,收集细胞培养上清,ELISA 检测乙肝标记物 HBsAg 和 HBeAg,5 例样本均为阳性结果,见图 4;转染后 5 d 提取细胞内核心颗粒 HBV DNA,

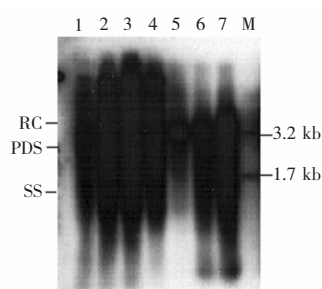
用 Southern blot 检测,检测结果显示环化的 HBV 转染细胞后,HBV 均有复制。结果见图 5。



+. ELISA 试剂盒提供的阳性对照; -. ELISA 试剂盒提供的阳性对照; 1~5. 检测样本

图 4 ELISA 检测转染细胞上清中 HBsAg 和 HBeAg 的表达

Fig.4 Expressions of HBsAg and HBeAg in transfection cultures by ELISA assay



1~5. 全长环化转染 HuH7 细胞后, Southern blot 检测复制中间体; 6~7. pcDNA-HBV1.3 质粒转染阳性对照; M. 3 200 bp 和 1 700 bp Marker; RC. 松弛环状 DNA; PDS. 部分双链线性 DNA; SS. 单链线性 DNA

图 5 Southern blot 检测 HBV 复制

Fig.5 Southern blot of product of HBV replication

3 讨论

本实验建立了一种从低拷贝 HBV 模板中扩增全长的方法,应用此方法成功扩增得到 5 例样本的全长。扩增得到的 HBV 全长 DNA 经连接环化后转染 HuH7 细胞,通过 ELISA 和 Southern blot 实验进行了 HBV 体外复制水平的鉴定和评价,结果表明从临床样本中扩增得到的全长 HBV DNA 经连接环化后能够有效地进行体外复制表达。

由于 HBV 基因组全长的特殊结构,使得全长扩增较为困难, Gunther 等^[2-3]设计的跨缺口扩增全长引物实现了一步法扩增 HBV 全长,但是对于拷贝数低的 HBV 模板,特别是临床样本,一步法扩增全长几乎无法实现。本文通过针对 HBV 序列保守区设计特异性引物进行分段扩增,巢氏扩增的方法提高了片段扩增的效率,2 个片段约有 240 个碱基互

补配对,片段之间的互补配对区可互为引物延伸扩增成为全长扩增模板。最终建立了分段巢式 PCR 扩增低拷贝 HBV 全长 DNA 的方法。该方法用于临床血清样本中低拷贝 HBV 的全长制备和克隆具有较好的成功率,可为后续的基因序列分析和研究打下良好的基础。

有文献报道 HBV 全长扩增过程中高退火温度能够提高产物特异性,并且获得更高的扩增效率^[7-9]。在本文中,片段 I 与片段 II 在温度降落 PCR 55℃~50℃的条件下均能得到较好的扩增效果。在融合扩增时片段 I 与片段 II 需要等摩尔浓度以使其能够更好的融合延伸;本文中融合扩增反应体系为 20 μl 体系,经过摸索条件,加入片段量不宜过小,约 300 ng 左右可得到满意效果;由于 2 个片段之间有约 240 个互补配对碱基,退火温度可选择较高温 60℃;反应循环数 10~13 个循环均可。有文献提出 HBV 全长扩增延伸时间随着循环数增加而增加可提高扩增效率,本文中使用固定延伸时间 2 min 可稳定扩增出 HBV 全长。

在 HBV 片段扩增及全长扩增中发现,提取的病毒 DNA 作为模板反复冻融及长时间-20℃冻存可能降低其 PCR 扩增效率,有样本新鲜提取病毒 DNA 可顺利扩增出片段及全长,但是经过冻融及一段时间后再次扩增,需要加大模板量甚至无法扩增出结果,考虑到病毒 DNA 的降解及破坏等因素,因此本实验中在 HBV 病毒 DNA 提取后进行少量多支分装保存,并且尽量在短时间内使用以便得到更为理想的结果。

从临床低拷贝病毒血清中全长扩增得到 HBV DNA 后,如何进行快速有效地鉴定其功能,是比较关键的问题。传统方法必须将 HBV 全长 DNA 通过多次酶切连接制备为 1.3 倍体,再克隆到真核表达载体上(例如 pCDNA3.1 质粒),再通过大量制备重组表达质粒后转染细胞,观察并检测 HBV 在细胞中的复制能力和水平。这种方法工作量大,无法适用于短时间内对较多样本数同时进行检测和评价的情况。本实验采用 HBV 全长 DNA 环化连接的方法,可以完全回避制备 HBV1.3 倍体重组表达质粒的过程,节约大量的时间和工作量。闭合环状的 HBV 全长 DNA 相当于 cccDNA,将其转染 HuH7 细胞可以最大程度的模拟 HBV 自然感染细胞的状态,避免外源启动子的影响,对各 HBV 样本自身复制水平的评价最为客观真实。本实验中得到的 5 例 HBV DNA 通过 Southern blot 检测复制中间体,结果显示均有复制表达。并且发现,虽然是临床检测为小三

阳的 HBV 样本,可是在体外进行复制水平评价的过程中,可以看到 HBeAg 的表达得到了恢复(图 4、图 5),说明病毒体本身的 HBeAg 的表达能力是正常的,而临床检测得到的结果(HBeAg 阴性)可能不是由病毒 DNA 序列造成的。通过本实验建立起来的对 HBV 临床样本的体外复制水平评价方法能够最大程度的保持病毒体在细胞内的原始感染行为,为进一步研究低拷贝病人血清中 HBV 病毒的自身复制水平与其 DNA 序列关系打下基础。

参 考 文 献

- [1] 骆抗先.乙型肝炎基础和临床[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2007:4-9.
- [2] Luo K X.Hepatitis B basic biology and clinical science[M].3rd ed.Beijing:People's Medical Publishing House Press,2007:4-9.
- [3] Gunther S,Li B C,Miska S,et al.A novel method for efficient amplification for whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutant in immunosuppressed patients[J].J Virol,1995,69(9):5437-5444.
- [4] Gunther S,Sommer G,Von Breunig F,et al.Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia;frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations[J].Journal of Clinical Microbiology,1998,36(2):531-538.
- [5] 袁 权,葛胜祥,张天英,等.高灵敏度巢式 PCR 方法扩增 HBV 全长基因组[J].厦门大学学报(自然科学版),2011,50(5):947-950.
- [6] Yuan Q,Ge S X,Zhang T Y,et al.Amplification of complete hepatitis B virus genome by a sensitive nested PCR[J].Journal of Xiamen University (Natural Science),2011,50(5):947-950.
- [7] Qin Y,Zhang J,Garcia T,et al.Improved method for rapid and efficient determination of genome replication and protein expression of clinical Hepatitis B virus isolates[J].J Clin Microbiol,2011,49(4):1226-1233.
- [8] Garcia T,Li J,Sureau C,et al.Drastic reduction in the production of subviral particles dose not impair hepatitis B virus virion secretion [J].Journal of Virology,2009,83(21):11152-11165.
- [9] 郭进军,黄爱龙,赵中夫,等.全长乙型肝炎病毒基因组的扩增及序列分析[J].中华肝病杂志,2003,11(10):592-594.
- [10] Guo J J,Huang A L,Zhao Z F,et al.A new method for amplification and sequence analysis of the full-length of HBV genome [J].Chinese Journal of Hepatology,2003,11(10):592-594.
- [11] Tellier R,Bukh J,Emerson S U,et al.Long PCR and its application to hepatitis B viruses;amplification of hepatitis A,hepatitis B,and hepatitis C virus genomes[J].J Clin Microbiol,1996,34(12):3085-3091.
- [12] 李 端,闫永平,周红超,等.乙型肝炎病毒全长基因的扩增[J].第四军医大学学报,2002,23(6):572-573.
- [13] Li D,Yan Y P,Zhou H C,et al.A novel method to efficient amplification of the full-length genome of hepatitis B virus[J].Journal of the Fourth Military Medical University,2002,23(6):572-573.

(责任编辑:关蕴良)