

技术前沿

DOI: 10.11699/cyxb20131201

体外培养细胞内乙肝病毒共价闭合环状 DNA 检测方法的建立

黄 荣, 陈江燕, 胡接力, 罗英英, 黄爱龙

(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:建立一种体外培养细胞内乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)的检测方法。**方法:**Southern blot 检测 HBV 复制中间体,以确认 HepAD38、HepG2.2.15 和 P+P-细胞是否支持 HBV 复制;用 Hirt 法分别提取细胞内的去蛋白 DNA(protein-free DNA, PF DNA),经加热变性处理, *EcoR* I 酶切,然后用 Southern blot 检测 HBV cccDNA;用同样方法检测不同培养时间的 HepAD38 细胞内 cccDNA,观察培养时间对 cccDNA 积累量的影响。**结果:**用 Southern blot 可在 HepAD38、HepG2.2.15 和 P+P-细胞中检测到 HBV 复制中间体;Hirt 法提取物经变性和酶切处理,可有效地将 cccDNA 与其他形式 HBV DNA 区分开;HepAD38、HepG2.2.15 和 P+P-细胞内均可检测到 HBV cccDNA;HepAD38 细胞在铺满后继续培养的时间较长时,其细胞内 cccDNA 的量较多。**结论:**成功建立了体外培养细胞内 HBV cccDNA 检测方法,该方法结合 Hirt 提取法和地高辛探针 Southern blot 方法,能可靠、准确地检测 HBV cccDNA。

【关键词】乙型肝炎病毒;共价闭合环状 DNA;Southern blot**【中国图书分类法分类号】**R373.21**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-04-22

A method for detecting intracellular HBV covalently closed circular DNA in cultured cells in vitro

HUANG Rong, CHEN Jiangyan, HU Jieli, LUO Yingying, HUANG Ailong

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

【Abstract】Objective: To establish a method for detecting hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in cultured cells in vitro. **Methods:** Southern blot was used to detect the HBV replication intermediates from HepAD38, HepG2.2.15 and P+P- cell lines to confirm their capability of supporting HBV replication. Extraction of protein-free DNA (PF DNA) was carried out with a modified Hirt extraction procedure from HepAD38, HepG2.2.15 and P+P- cells, which were cultured for several days after the cells growing to confluence. The cccDNA was thermally denatured and then subjected to *EcoR* I digestion before Southern blot analysis. Dynamic changes of HBV cccDNA in HepAD38 cells at different growth time were examined. **Results:** HBV replication intermediates were detectable in HepAD38, HepG2.2.15 and P+P- cells by Southern blot. HBV cccDNA extracted from HepAD38, HepG2.2.15 and P+P- cells can be effectively distinguished from other forms of HBV DNA in Southern blot. A larger amount of HBV cccDNA was detected when HepAD38 cells grew more time after confluence. **Conclusions:** A method for detecting intracellular HBV cccDNA is successfully established. This method combines Hirt extraction procedure with digoxigenin-probe-based Southern blot, allowing us detect HBV cccDNA accurately and faithfully.

【Key words】hepatitis B virus; covalently closed circular DNA; Southern blot

乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个严重的公共卫生问题,其涉及范围广泛且后果较严重。HBV 感染肝细胞后,病毒基因组 DNA 即松弛环

状 DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)进入肝细胞核内转变为共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA),其作为模板转录合成前基因组 RNA(pre-genomic RNA, pgRNA),后者再逆转录形成 rcDNA。rcDNA 可包装形成成熟的病毒颗粒而继续感染其他肝细胞,也可再进入肝细胞核内转变为 cccDNA 以维持 cccDNA 池的稳定^[1]。由此可见,

作者介绍:黄 荣, Email: huangrongsure@163.com,

研究方向:乙肝病毒的致病机制。

通信作者:胡接力, Email: hujieli1977@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81000732);重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2011jjA10005)。

cccDNA 是 HBV 生活周期的一个核心关键分子。对 cccDNA 进行深入研究,不但关系到对 HBV 生命过程的充分认识,而且与寻找清除感染细胞内 cccDNA 的策略密切相关。

研究 cccDNA 分子及其相关事件,首先要求能分离和检测 cccDNA。然而,由于细胞内 cccDNA 含量很低,而且胞内同时存在较大量与 cccDNA 序列同源或结构类似的其他形式 HBV DNA[包括 rcDNA、双链线性 DNA(double-stranded linear DNA, dsDNA)及单链 DNA(single-stranded DNA, ssDNA)],使得 cccDNA 的准确检测颇为困难。现有的 HBV cccDNA 检测方法,不少是基于选择性 PCR 而建立^[2]。所谓选择性 PCR,是依据 rcDNA 的正链和负链上均存在缺口而设计跨越 2 个缺口的引物,从而使 rcDNA 不会被扩增,而 cccDNA 可被选择性扩增。这类方法有一个重要缺点:当反应体系中 rcDNA 模板量较高时,以不完整的 2 条链为模板形成的单链延伸产物之间可自身退火而导致假阳性结果。此外,还有嵌合引物定量 PCR 法^[3]和探针侵入分析法^[4],其区分 cccDNA 和 rcDNA 的主要依据是 rcDNA 的正链不完整,因而嵌合引物或初始探针不能与之互补结合,但是都忽视了 dsDNA 也可以被扩增。本研究中以体外培养的细胞为实验模型,建立了 HBV cccDNA 检测方法,该方法结合 Hirt 提取法和地高辛探针 Southern blot 方法,能可靠、准确地检测 HBV cccDNA,介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HepAD38 细胞系由 Ladner 等^[5]构建,四川大学华西医院唐红教授惠赠;HepG2.2.15 细胞系由本实验室保存;P+P-细胞系为本实验室构建的稳定表达 HBV 细胞系(待发表结果)。

1.1.2 主要试剂 MEM 购于 Hyclone 公司,DMEM、胎牛血清和非必需氨基酸(NEAA, 10×)购于 Gibco 公司,地高辛标记检测试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II)及尼龙膜(Nylon Membranes, positively charged)购于 Roche 公司,限制性内切酶 *EcoR* I 为 NEW ENGLAND Biolabs 公司产品, DNase I 为 Promega 公司产品, RNase A 为 Merck 公司产品。

1.2 细胞培养

HepAD38、HepG2.2.15 细胞系培养于含 10% 胎牛血清、500 μg/ml G418 的 MEM 培养基中, P+P-细胞系培养于含

10% FBS、5 μg/ml Blasticidin、300 μg/ml G418、NEAA(10×)的 DMEM 培养基中,在含 5% CO₂、37 °C 孵箱中常规培养。

1.3 细胞内 HBV 复制中间体的提取

HepAD38、HepG2.2.15、P+P-细胞系分别于 35 mm 培养皿长满后继续培养 3 d,收集细胞提取细胞质核心颗粒 HBV DNA,具体方法同文献[6],简述如下:细胞用 PBS 洗涤后,加入 400 μl 细胞裂解液(10 mol/L Tris-Cl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 1% NP40, 2% 蔗糖), 37 °C 孵育 15 min; 15 000 g 离心 3 min, 转移上清至 1.5 ml EP 管中;加入 MgCl₂ 溶液至终浓度为 10 mmol/L, 然后依次加入 DNase I 和 RNase A, 终浓度分别为 40 U/ml 和 1 mg/ml, 37 °C 孵育 3 h;反应完成后,每管加入含有 1.5 mol/L NaCl 的 35% PEG 8000 140 μl, 冰浴 1 h; 11 000 g, 4 °C 离心 5 min, 弃上清;每管加入 400 μl 消化缓冲液(0.5% SDS, 2.5 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl)及终浓度 1 mg/ml 的蛋白酶 K, 42 °C 消化 3 h;常规酚氯仿抽提 2 次,乙醇沉淀,产物溶于 8 μl 的 Elution 缓冲液, -20 °C 保存备用。

1.4 细胞内 HBV 去蛋白 DNA 提取

培养于 10 cm 培养皿的细胞长满后继续培养数天, Hirt 法^[7]提取去蛋白 DNA(protein-free DNA, PF DNA), 具体步骤如下:细胞用 PBS 洗涤后,向 10 cm 培养皿的细胞中加入 1 ml SDS 裂解液[50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 10 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, and 1% SDS], 37 °C 孵育 15~20 min。将细胞裂解液全部转移到 2 ml 的 EP 管,加入 0.25 ml 的 2.5 mol/L KCl 溶液,轻柔地颠倒 5~10 次,放冰上轻摇孵育 8 h 以上。14 000 g, 4 °C 离心 30 min。将上清全部转移到 2 ml EP 管,常规酚氯仿抽提 3 次。将水相转移到 1.5 ml EP 管中,加入 70% 体积的异丙醇,混匀后 4 °C 放置 1 h。16 500 g, 4 °C 离心 30 min。75%乙醇洗涤 2 次,干燥后溶于 10 μl Elution 缓冲液, -20 °C 保存备用。

1.5 HBV cccDNA 的鉴定与检测

3 个 10 cm 培养皿的 HepAD38 细胞长满后继续培养 7 d, Hirt 法分别提取细胞内去蛋白 DNA,所得的全部去蛋白 DNA 混匀后均分为 3 份做不同处理:不处理、95 °C 热变性 10 min、95 °C 热变性 10 min 后限制性内切酶 *EcoR* I 酶切(酶切条件: 37 °C, 30 min),然后全部上样电泳, Southern blot 检测。

1.6 HBV DNA 的 Southern blot 检测

将提取的 HBV DNA 样品经 0.9% 琼脂糖凝胶电泳后, 用向下转膜法^[8-9]转印到带正电荷的尼龙膜, 120 °C 烤干固定后预杂交、杂交(地高辛标记的 HBV DNA 探针)、洗膜、封闭、孵抗体、检测,具体操作按照产品说明书进行。

2 结果

2.1 Southern blot 检测细胞内 HBV 复制中间体

对某种细胞内 cccDNA 检测的前提是该细胞能够支持 HBV DNA 复制,因此,在检测 cccDNA 前,首先检测了 Hep-

AD38、HepG2.2.15、P+P-细胞是否能持续表达 HBV 复制中间体。图 1 中结果显示在 HepAD38、HepG2.2.15、P+P-细胞内均能检测到 HBV 复制中间体,包括 rcDNA、dsIDNA、ssDNA,并且在 HepAD38 细胞系最强,HepG2.2.15 细胞系次之,P+P-细胞系最弱。

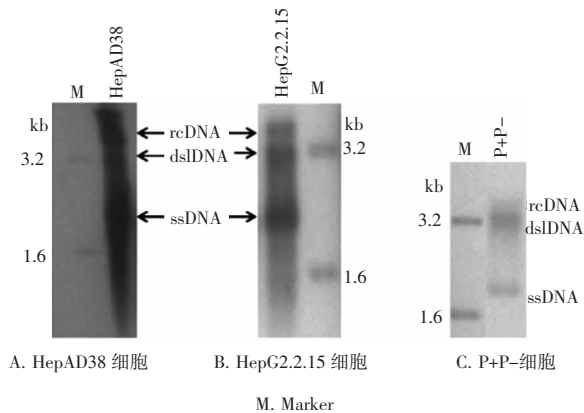


图 1 Southern blot 检测 HepAD38、HepG2.2.15 和 P+P-细胞内 HBV 复制中间体

Fig.1 Detection of HBV replication intermediates in HepAD38, HepG2.2.15 and P+P- cells by Southern blot

2.2 细胞内 cccDNA 的 Southern blot 检测原理

Hirt 法提取得到的 PF DNA 中不仅包含 cccDNA,还有 rcDNA、dsIDNA(图 2A)。为了区分 cccDNA 与其他 HBV DNA,根据三者间的结构和理化性质的不同,予加热 95 °C,10 min 使 rcDNA 和 dsIDNA 变性为 ssDNA,而 cccDNA 由于主要以超螺旋的闭合环状形式存在,加热后的 2 条环状单链会相互纠缠成团状,而不会分离^[10],温度迅速降低时,纠缠成团的单链由于空间距离接近,能够较快复性为双链。之后,再用限制性内切酶 *EcoR* I 酶切,由于热变性后的 DNA 中仅 cccDNA 为双链且仍存在 *EcoR* I 酶切位点,因此,只有 cccDNA 能够被 *EcoR* I 酶切为约 3.2 kb 的 dsIDNA,从而可以有效地将

热变性后的 ssDNA 与 cccDNA 区分开来。

为了确证 cccDNA 检测无误,本研究提取 HepAD38 细胞(10 cm 培养皿的细胞长满后继续培养 7 d)的去蛋白 DNA 分成 3 组做不同处理加以验证(图 2B)。未经任何处理的去蛋白 DNA(泳道 2)可见 rcDNA、dsIDNA、cccDNA 共 3 条带,其中 cccDNA 位于约 2.0 kb 的位置;95 °C 热变性(泳道 3)使 rcDNA 和 dsIDNA 变性为 ssDNA,而 cccDNA 依然为闭合环状,仍位于约 2.0 kb 的位置,但由于 ssDNA 也在该位置,使得两者难以在图中加以区分;95 °C 热变性后 *EcoR* I 酶切(泳道 4),可见闭合环状的 cccDNA 被酶切为线性双链,定位于约 3.2 kb 的位置,而 ssDNA 没有变化,得以有效地将 cccDNA 区分开来。也就是说,Hirt 法提取的细胞内 PF DNA 经 95 °C 热变性后经 *EcoR* I 酶切,Southern blot 检测时位于约 3.2 kb 的 DNA 代表的就是 cccDNA。

2.3 P+P-细胞及 HepG2.2.15 细胞内 cccDNA 的检测

为了进一步验证该检测方法的实用性和有效性,用同样的方法对另外 2 株 HBV 复制细胞,即 P+P-细胞和 HepG2.2.15 细胞内 cccDNA 进行了检测。分别提取 P+P-细胞(2 个 10 cm 培养皿的细胞长满后继续培养 8 d)及 HepG2.2.15 细胞(2 个 10 cm 培养皿的细胞长满后继续培养 6 d)的 PF DNA,经 95 °C 热变性后 *EcoR* I 酶切,Southern blot 检测(图 3)。结果显示,2 种细胞的样品均能检测到约 3.2 kb 的 DNA 条带,说明该方法成功地检测出了 P+P-细胞及 HepG2.2.15 细胞内 cccDNA。此外由图 3 还可以看出,2 种细胞内 cccDNA 的量是不一样的,P+P-细胞较少,HepG2.2.15 细胞相对较多。

2.4 不同培养时间 HepAD38 细胞内 cccDNA 数量的变化

为了解不同培养时间对 cccDNA 形成量的影响,分别在 HepAD38 细胞铺满培养皿后继续培养 3、5、7 d 后收集细胞,提取细胞内 PF DNA,经热变性后 *EcoR* I 酶切,Southern blot 检测 cccDNA 数量的变化(图 4)。图中泳道 2、4、5 中 3.2 kb 位置的条带代表酶切后的 cccDNA,可见随着培养时间的延长,cccDNA 有逐渐增加的现象。

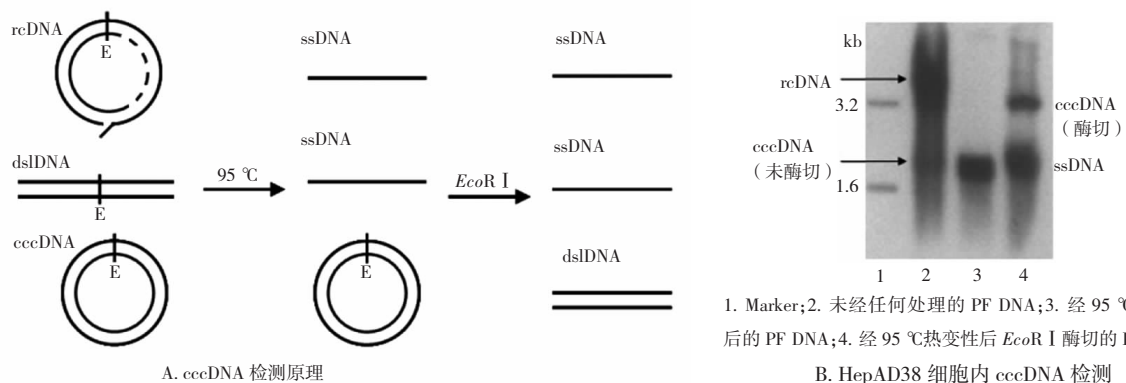


图 2 细胞内 cccDNA 的检测及原理

Fig.2 Detection and principle of intracellular HBV cccDNA

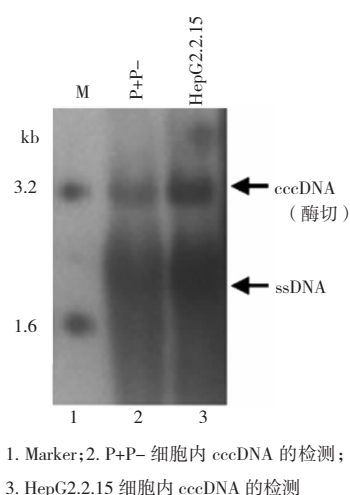


图 3 P+P- 细胞、HepG2.2.15 细胞中 cccDNA 的检测
Fig.3 Detection of cccDNA in P+P- and HepG2.2.15 cells by Southern blot

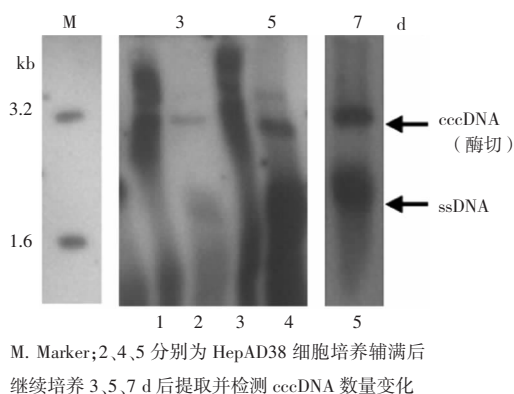


图 4 不同培养时间 HepAD38 细胞内 cccDNA 数量的变化
Fig.4 Dynamic changes of HBV cccDNA expressions in HepAD38 cells at different culture time

3 讨论

本文描述了 1 种基于 Southern blot 的细胞内 HBV cccDNA 检测方法,即热变性加 *EcoR* I 酶切后 Southern blot 检测的方法。通过对 HepAD38 细胞、P+P- 细胞及 HepG2.2.15 细胞内 cccDNA 的检测,证明该方法有效且实用。

该方法在实际操作中,有以下几方面需要注意:(1)提取的 Hirt DNA 直接用 Southern blot 检测时,常不能很好区分 cccDNA 与其他形式 HBV DNA (如图 2B 中泳道 2),需要增加变性后酶切处理步骤,以使条带区分更明显;(2)由于 cccDNA 在细胞内的含量很低,每个细胞内约有 1~50 个 cccDNA 分子^[1],因此,用于检测的细胞有一定的要求,建议待细胞在培养皿中长满继续培养数天后再提取和检

测,因其 cccDNA 量在此时会有所增加而有利于检测;(3)提取 cccDNA 时,由于细胞内主要的 rcDNA、dsDNA 及 ssDNA 均位于核衣壳蛋白内,且末端与 P 蛋白共价结合,易于与十二烷基硫酸钠结合,加氯化钾后即形成沉淀,通过离心可有效分离,得到 PF DNA^[12],该提取过程不能加入蛋白酶消化,否则会增加对其他形式 HBV DNA 的提取,降低了特异性;(4)提取的 PF DNA 在 95 °C 加热变性后,一定要立即放冰上,防止已变性为单链的 DNA 复性为双链而干扰检测结果。

另外本研究发现,长满后继续培养的 HepAD38 细胞内 cccDNA 量有随着培养时间的延长而逐渐增加的现象,这样的结果与 Chong 等^[13]的研究结果相似。可能原因是,细胞长满后消除了因细胞有丝分裂对细胞内 cccDNA 的质粒稀释样作用^[14],使得在细胞长满而停止有丝分裂后的一段时间内出现一定程度上 cccDNA 量的累积。这也再次说明在细胞长满后继续培养一段时间再提取和检测会更容易。

与大多基于选择性荧光定量 PCR^[15]检测 cccDNA 方法相比,本文所述的方法虽有一定的技术难度,操作步骤较复杂,但该方法特异性和准确性更好,检测结果更可信,适合用来对实验结果的最终确定。

参 考 文 献

- [1] Levrero M, Pollicino T, Petersen J, et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2009, 51(3): 581-592.
- [2] Kock J, Schlicht H J. Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication; genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity[J]. J Virol, 1993, 67(8): 4867-4874.
- [3] Shao J B, Chen Z, Ni W Q, et al. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction[J]. J Virol Methods, 2003, 112(1-2): 45-52.
- [4] Wong D K, Yuen M F, Yuan H, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients[J]. Hepatology, 2004, 40(3): 727-737.
- [5] Ladner S K, Otto M J, Barker C S, et al. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(8): 1715-1720.
- [6] 黄 媛, 陶 颖, 张文露, 等. 一种新的 DNA 分子克隆方法[J]. 中国科学: 生命科学, 2011, 41(9): 722-729.
- Huang Y, Tao Y, Zhang W L, et al. A new method for DNA molecular cloning[J]. Scientia Sinica Vitae, 2011, 41(9): 722-729.

技术前沿

DOI: 10.11699/cyxb20131202

全外显子组测序分析中预处理方法和变异识别方法的比较

闫 瑾, 潘 琦, 任 红

(重庆医科大学附属第二医院感染科、重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 重庆 400010)

【摘要】目的:比较全外显子组数据分析中不同的预处理方法和变异过滤方法对变异识别的影响。**方法:**利用 2 例全外显子组测序数据,从使用不同的预处理方法(FASTX-Toolkit、Trimmomatic 及未做预处理)、修饰后不成对读长(single-end reads, SE)取舍策略以及变异过滤方法[Hard 过滤和变异质量得分重新校正(variant quality score recalibration, VQSR)]3 个方面,通过数据覆盖深度(depth of coverage, DP)、识别变异的数目、转换/颠换比值和基因型一致性等特征,比较他们对全外显子组变异识别结果的影响。**结果:**Trimmomatic 预处理后的读长测序 DP 与未预处理的原始数据接近,但明显高于 FASTX-Toolkit 预处理方法。当 $DP \geq 10 \times$ 且基因型质量分数(genotype quality score, GQ) ≥ 20 时,经 Trimmomatic 预处理后识别到的单核苷酸变异(single nucleotide variant, SNV)数量比 FASTX-Toolkit 多,与未预处理组接近。当包含 SE 时,FASTX-Toolkit 组多识别出的 SNV 数量高于(28%)Trimmomatic 组(5%)。当样本量较少时,在所有实验组中 Hard 过滤方法滤掉的 SNV 要少于 VQSR。**结论:**Trimmomatic 修饰(过滤)原始序列更温和,而 FASTX-Toolkit 可能过度过滤了原始数据。保留 SE 有利于下游变异识别。Hard 过滤相较于 VQSR 表现出了更高的容忍度。

【关键词】全外显子组测序;预处理;变异识别**【中国图书分类法分类号】**R857.3; Q344+.12**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-03-26

Comparison of methods of pre-processing and variant filtering in analyzing whole exome sequencing data

YAN Jin, PAN Qi, REN Hong

(Department of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate effects of methods of pre-processing and variant filtering on variant recognition in analyzing whole exome sequencing data. **Methods:** Through the calculation of depth of coverage (DP), number of variants, transition/transversion and

作者介绍: 闫 瑾, Email: essq37-3-9@163.com,

研究方向: 病毒性肝炎相关性肝细胞肝癌的全外显子组分析。

通信作者: 任 红, Email: renhong0531@vip.sina.com。**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(编号: 30930082)。

[7] Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture[J]. J Mol Biol, 1967, 26(2): 365-369.

[8] 张秉强, 吴 莹, 唐 霓, 等. 向下转膜法在乙肝病毒 Southern 杂交中的应用[J]. 生物技术通报, 2005(2): 26-28.

Zhang B Q, Wu Y, Tang N, et al. Application of downward capillary transfer in the southern blotting of HBV[J]. Biotechnology Bulletin, 2005(2): 26-28.

[9] 崔 静, 胡接力, 张文露, 等. 化学发光法检测体外 HBV 复制[J]. 生物技术, 2009, 19(2): 26-28.

Cui J, Hu J L, Zhang W L, et al. Analysis of hepatitis B virus replication in vitro by chemiluminescent detection method[J]. Biotechnology, 2009, 19(2): 26-28.

[10] Lodish H, Berk A, Zipursky S L, et al. Molecular cell biology[M]. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2000.

[11] Newbold J E, Xin H, Tencza M, et al. The covalently closed duplex

form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes[J]. J Virol, 1995, 69(6): 3350-3357.

[12] Kock J, Theilmann L, Galle P, et al. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus[J]. Hepatology, 1996, 23(3): 405-413.

[13] Chong C L, Chen M L, Wu Y C, et al. Dynamics of HBV cccDNA expression and transcription in different cell growth phase[J]. J Biomed Sci, 2011, 18(1): 96.

[14] Jang J H, Rives C B, Shea L D. Plasmid delivery in vivo from porous tissue-engineering scaffolds: transgene expression and cellular transfection[J]. Mol Ther, 2005, 12(3): 475-483.

[15] He M L, Wu J, Chen Y, et al. A new and sensitive method for the quantification of HBV cccDNA by real-time PCR[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 295(5): 1102-1107.

(责任编辑: 冉明会)