

• 论 著 •

乙型肝炎病毒阿德福韦酯耐药株(RT A181T)感染性克隆的构建及在 Huh7 细胞中的表达^{*}

赵建华, 陆仁飞[△]

(江苏省南通市第三人民医院检验科 226006)

摘 要:目的 利用重叠延伸聚合酶链反应(SOE-PCR)快速构建乙型肝炎病毒(HBV)阿德福韦酯耐药株(RT A181T)感染性克隆,观察重组质粒在 Huh7 细胞中的表达,建立 HBV 阿德福韦酯耐药株(RT A181T)的体外研究细胞模型。方法 设计保守引物,从慢性乙型肝炎阿德福韦酯耐药患者血清中扩增全长 HBV 基因组,利用 SOE-PCR 技术构建 1.3 倍基因组长度的感染性克隆质粒 pHBV1.3,转染肝癌细胞系 Huh7,采 Western Blot、Real-time PCR 检测感染性克隆复制以及表达情况,同时用抗病毒药物拉米夫定以及阿德福韦酯验证对感染性克隆复制及表达的抑制情况。结果 成功构建了 HBV 阿德福韦酯耐药株感染性克隆质粒 pHBV1.3(RT A181T),该质粒在 Huh7 细胞系中能有效复制、转录和表达。拉米夫定能有效抑制该感染性克隆的复制和表达,阿德福韦酯不能抑制该感染性克隆的复制和表达。结论 构建的 HBV 阿德福韦酯耐药株感染性克隆质粒 pHBV1.3(RT A181T)在体外能高效复制及表达蛋白,其转染细胞可用于 HBV 复制机制及抗病毒研究。

关键词:乙型肝炎病毒; 阿德福韦酯; 耐药; 感染性克隆

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)23-3266-03

Construction of infectious clone of HBV adefovir-resistant strain RT A181T and its expression in Huh7 cells^{*}

ZHAO Jianhua, LU Renfei[△]

(Department of Clinical Laboratory, Nantong Municipal Third People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226006, China)

Abstract:Objective To rapidly construct hepatitis B virus(HBV) adefovir(ADV)-resistant strain(RT A181T) infectious clone by using SOE-PCR, to observe the expression of recombinant plasmids in Huh7 cells and to establish the in vitro cell model of HBV ADV-resistant strain(RT A181T). **Methods** The conservative primers were designed, the full-length HBV genome was amplified from serum in the patients with ADV-resistant chronic hepatitis B. Then, the 1.3-fold genome-length infectious clone pHBV1.3 was constructed by using the SOE-PCR technique, which was transfected into human hepatoma cells Huh7 cell line. ELISA, Western Blot and Real-time PCR were adopted to detect infectious cloning replication and expression, meanwhile the antiviral drugs lamivudine(LAM) and ADV were used to verify the infectious clone copy and inhibition of expression. **Results** The HBV ADV-resistant infectious cloning plasmids pHBV1.3 was successfully constructed. This plasmid could be effectively replicated, transcribed and expressed in Huh7 cell lines. LAM could effectively inhibit the replication and expression of the infectious clone, while ADV could not inhibit the replication and expression of the infectious clone. **Conclusion** The constructed infectious clone plasmids pHBV1.3(RT A181T) of HBV ADV-resistant strain can efficiently replicate and express protein in vitro, its transfected cells can be used in the study of HBV replication mechanism and antiviral study.

Key words: hepatitis B virus; adefovir; drug resistance; infectious clone

乙型肝炎病毒(HBV)感染在全世界广泛流行,据文献报道全球约有 20 亿人感染过 HBV,每年大约有 100 万人死于因 HBV 感染而继发的慢性乙型肝炎、肝硬化和原发性肝癌,严重影响了人类的健康^[1-3]。开展 HBV 研究的困难之一就是缺乏很好的体内感染动物模型及体外感染细胞模型。目前,体外感染的细胞模型主要以稳定表达 HBV 的 HepG2. 2. 15 细胞系为主^[4]。该 HBV 的病毒基因型为 D 型、血清型为 ayw 的野生型^[5]。近年来,拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦及替比夫定等核苷(类)抗病毒药物已经广泛应用于慢性乙型肝炎的临床治疗。随着大范围、长时间的抗病毒药物治疗,HBV 耐药问题已经成为临床慢性乙型肝炎治疗的棘手问题^[6]。相应的,构建各种耐药株的感染性克隆用于 HBV 复制机制以及抗病毒研究已显得十分迫切与必要。大量研究证实,HBV 的 1. 1、1. 2、1. 3 倍体重质粒均能在人类的肝癌细胞系中完成核酸的复制及相关蛋白的表达,其中 1. 3 倍体 HBV 核酸复制水平和蛋白

表达水平是最高的^[7-8]。本研究从慢性乙型肝炎阿德福韦酯耐药患者血清中扩增全长 HBV 基因组,利用重叠延伸聚合酶链反应(SOE-PCR)技术快速构建 1. 3 倍 HBV 的感染性克隆质粒 pHBV1. 3(RT A181T),在体外验证了该感染性克隆的核酸复制、蛋白表达以及抗病毒药物耐药情况。

1 材料与方法

1. 1 细胞培养 人肝癌细胞株 Huh7 用含 10% 胎牛血清(Gibco 公司)、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基、37℃、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 方法

1. 2. 1 HBV 阿德福韦酯耐药株基因组 DNA 的提取 HBV 血清标本均来源于南通大学附属第三医院检验科,患者均长期服用阿德福韦酯,并出现病毒学突破被诊断为阿德福韦酯临床耐药,标本中 HBV 的 DNA 载量在 10⁴~10⁷ copy/mL。磁分

^{*} 基金项目:江苏省南通市卫生和计划生育委员会资助项目(WQ2014038, W201217);江苏省南通市科技局资助项目(HS2014062)。

作者简介:赵建华,男,副主任技师,主要从事临床微生物研究。 [△] 通讯作者, E-mail:rainman78@163. com。

离试剂盒(北京鑫诺美迪公司)抽提 HBV DNA,提取方法严格参照说明书,提取的 HBV DNA 在 -20°C 保存备用。

1.2.2 HBV 全长基因组的克隆 参考文献[9]的引物设计, F1: 5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3'; R1: 5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G-3'。以上述方法提取的 HBV DNA 为模板,采用高保真性聚合酶 KOD plus (Toyobo 公司)进行 PCR 扩增,DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物有限公司)琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物,用平末端克隆载体试剂盒 pEASY-Blunt Zero cloning kit(北京全式金公司)连接目的片段和载体,然后转化感受态细胞 TOP10(Tian-gen 公司),涂板过夜培养,挑取单菌落,酶切鉴定,阳性菌落送上海迈浦生物公司测序。测序结果采用 MEGA5 软件 BLAST 分析。

1.2.3 利用 SOE-PCR 构建 1.3 倍体 HBV 利用 SOE-PCR 技术构建 HBV 的感染性克隆-1.3 倍体 HBV(阿德福韦酯耐药,RT A181T),命名为 pHBV1.3(RT A181T),测序验证。

1.2.4 感染性克隆 Huh7 细胞的转染及表达 感染性克隆 pHBV1.3(RT A181T)用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)脂质体转染肝癌细胞系 Huh7,转染方法参照说明书。共转染 3 种质粒,实验组为质粒 pHBV1.3(RT A181T),转染空载体 pBluescript KS(+)(阴性对照)和 pHBV1.3(C)质粒(阳性对照)。转染后 6 h 换液,48 h 后分别吸取培养上清液和收集细胞,通过免疫印迹实验检测蛋白表达水平,Real-time PCR 检测复制水平。

1.2.5 免疫印迹试验 裂解转染后的 Huh7 细胞,上样,SDS-PAGE 电泳,电泳结束后转膜,转膜后 5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4°C 孵育过夜。一抗使用浓度如下:鼠抗-HBs 单克隆抗体 1:1 000 稀释,兔抗-HBc 单克隆抗体 1:4 000 稀释,兔抗-GAPDH 单克隆抗体 1:1 000 稀释,抗体均购自 Santa Cruz 公司。孵育结束后洗膜,加二抗室温孵育 1 h,二抗使用浓度如下:HRP 标记的羊抗-鼠 IgG 1:5 000 稀释,HRP 标记的驴抗-兔 IgG 1:5 000 稀释,二抗均购自 Sigma 公司。孵育结束后洗膜。用化学发光显色试剂盒 Immobilon Western (Millipore 公司)暗室显影。

1.2.6 Real-time PCR 试验 采用 HBV 实时荧光定量试剂盒(上海科华生物工程有限公司)检测转染后分泌到培养上清液中的 HBV DNA 载量,具体操作步骤以及扩增条件按照产品说明书进行,PCR 仪(ABI7500)。

1.2.7 药物敏感试验 感染性克隆 pHBV1.3(RT A181T)转染 Huh7 肝癌细胞系 12 h 后,换成含不同浓度拉米夫定(0、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的培养基和不同浓度阿德福韦酯(0、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培养基,继续培养 36 h,分别收集上清液和细胞,检测核酸复制水平和蛋白表达水平。

2 结 果

2.1 HBV 阿德福韦酯耐药株基因组的克隆 收集 7 份 HBV 阿德福韦酯耐药患者血清,提取 HBV DNA。以提取的 HBV DNA 为模板,采用高保真性聚合酶进行扩增。PCR 扩增后与载体连接,转化大肠杆菌 TOP10 并涂板,挑取单克隆酶切鉴定,结果显示:在载体中插入了一个大小约 3 200 bp 的 DNA 片段,阳性克隆送测序。测序结果 BLAST 分析显示,克隆到的这株 HBV,基因组的 C、X、P 和 S 区 4 个 ORF 区均完整无致死性突变,但在反转录区 181 位置出现了 A $\rightarrow$ T 的突变,表明克隆的这株 HBV 发生了阿德福韦酯的基因型耐药,将克隆到的这株阿德福韦酯耐药的 HBV 全长基因组命名为 pHBV

(RT A181T)。

以克隆到的 pHBV(RT A181T)为模板进行亚克隆,通过 SOE-PCR 构建 1.3 倍体 HBV 感染性克隆,将构建的亚克隆 1.3 倍体 HBV 重组质粒以及空载体 pBluescript KS(+)进行酶切鉴定,1.3 倍体 HBV 重组质粒单酶切后呈线性片段,约 7 000 bp,EcoR I 和 Sal I 双酶切后可见 3 000 bp 位置和接近 4 300 bp 位置有两条明显的条带,即载体 pBluescript KS(+)和目的片段 HBV1.3,证实 1.3 倍体 HBV 重组质粒构建成功,命名为 pHBV1.3(RT A181T)。

2.2 感染性克隆 pHBV1.3(RT A181T)的体外复制

2.2.1 转染细胞表达乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎核心抗原(HBcAg) 为了验证感染性克隆 pHBV1.3(RT A181T)能否在 Huh7 细胞中表达 HBsAg、HBcAg,本研究进行了转染实验。感染性克隆 pHBV1.3(RT A181T)转染 Huh7 细胞 48 h 后,分别收集转染 pHBV1.3(RT A181T) Huh7 细胞培养上清液以及转染细胞,同时以未转染质粒的 Huh7 细胞为阴性对照,转染 pHBV1.3(C)的 Huh7 细胞为阳性对照。免疫印迹实验结果显示:和阳性对照一样,转染 pHBV1.3(RT A181T)的 Huh7 细胞的均明显表达蛋白 HBsAg、HBcAg,而阴性对照无相应蛋白表达。

2.2.2 转染细胞分泌 HBV DNA 为检测转染细胞是否分泌 HBV 颗粒,利用荧光探针 PCR 法检测培养上清液中 HBV DNA 的载量,结果显示:和阳性对照一样,转染 pHBV1.3(RT A181T)的 Huh7 细胞上清液中 HBV DNA 的滴度达到 10^6 copy/mL,而阴性对照未检测到 HBV DNA。

2.3 抗病毒药物敏感性检测 为检测转染 pHBV1.3(RT A181T)的 Huh7 细胞对药物的敏感性,将抗病毒治疗药物拉米夫定、阿德福韦酯加入到 pHBV1.3(RT A181T)的 Huh7 细胞中。在加入拉米夫定后,HBV 感染性克隆表达的蛋白 HBsAg、HBcAg 明显受到抑制,且与药物剂量正相关。而加入阿德福韦酯后,HBV 感染性克隆表达的蛋白 HBsAg、HBcAg 不受抑制。实验表明,所构建的感染性克隆 pHBV1.3(RT A181T)转染 Huh7 后,对拉米夫定敏感,对阿德福韦酯耐药。

3 讨 论

此前的报道中,构建 HBV 感染性克隆采用的方法一般都是以扩增的 HBV 基因组短片段基础上,通过几次酶切连接,拼接成 HBV 感染性克隆^[10-11]。这种方法耗时耗力,还受到酶切效率及酶切特异性的限制,很难精准构建合适起止位点的 1.3 倍体 HBV 感染性克隆。SOE-PCR 技术采用具有互补末端的引物,使模板链之间形成了重叠区域,从而在随后的延伸过程中沿着重叠部分延伸,将两条具有部分重叠区域的模板链拼接起来^[12-13]。该技术能够对目的基因进行快速、方便的片段重组,并且不需要内切酶和连接酶处理,利用该技术也能快速地将两条短片段合成一条长片段^[14]。通过精巧的引物设计,在线性 HBV 全基因组序列前面增加了一组内源性的 HBV 增强子和启动子,由此构建的 pHBV1.3(RT A181T)感染性克隆转染 Huh7 细胞后,将依赖自身启动子启动转录翻译,这样可以充分反映 HBV 病毒株的自身转录情况,有利于研究 HBV 复制和转录翻译的全过程。

在本研究中,从 HBV 阿德福韦酯耐药患者血清中扩增得到 1 株完整的 HBV 基因组,经局部系列比对基本检索工具分析显示,该株病毒基因组的 C、X、P 和 S 区 4 个 ORF 区均完整无致死性突变,并且在反转录区 181 位置出现了 A $\rightarrow$ T 的突变,表明发生了抗病毒药物阿德福韦酯基因型耐药。以克隆到的 HBV 全基因组为模板,通过 SOE-PCR 快速构建了 1.3 倍

体 HBV 感染性克隆 pHBV1.3(RT A181T)。pHBV1.3(RT A181T)是完整的病毒复制体,包含了 5'末端增强子 Enh I、Enh II、复制起始位点(DR1 和 DR2)、前基因组转录起始位点、X 开放读码框等,可转录产生 3.5、2.4、2.1、0.8 Kb 等所有 HBV 转录产物^[15-16]。

最后,将 pHBV1.3(RT A181T)感染性克隆转染 Huh7 细胞系。通过免疫印迹实验和 real-time PCR 等方法,验证了感染性克隆核酸复制及特异性蛋白合成的能力,结果显示构建的 pHBV1.3(RT A181T)感染性克隆具备完整的核酸复制及蛋白合成能力。而且,该感染性克隆对抗病毒药物拉米夫定敏感,对抗病毒药物阿德福韦酯耐药。因此,构建的 pHBV1.3(RT A181T)感染性克隆可用于 HBV 基础研究及临床抗病毒药物耐药研究。

本研究将 pHBV1.3(RT A181T)感染性克隆瞬时转染 Huh7 细胞株,HBV 在细胞内的复制以及相关蛋白的表达在转染 48 h 后达到峰值,随着时间的推移病毒的复制以及相关蛋白的表达都逐渐下降,因此将 pHBV1.3(RT A181T)感染性克隆稳定转染 Huh7 细胞株,构建稳定表达的细胞株将是下阶段实验的重点,为进一步研究 HBV 的结构和功能、表达与调控、病毒与宿主的关系、抗病毒药物的筛选提供研究工具。

参考文献

[1] Sergio H, Mauricio V, Javier B, et al. Full-Genome sequence of a Hepatitis B Virus genotype 1b clone from a chronically infected children patient [J]. *Genome Announc*, 2014, 25(2):1075-1074.

[2] Sibnarayan D, Soumya C, Vijay V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(40):14615-14625.

[3] Kim KH, Chang HY, Park JY, et al. Spontaneous HBsAg loss in Korean patients: relevance of viral genotypes, S gene mutations, and covalently closed circular DNA copy numbers[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2014, 20(3):251-260.

[4] Ze E, Baek EK, Lee JJ, et al. Long-term outcomes of two rescue therapies in lamivudine-refractory patients with chronic hepatitis B: combined lamivudine and adefovir, and 1-mg entecavir[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2014, 20(3):267-273.

[5] Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, et al. Phylogenetic analysis of complete genome sequences of hepatitis B virus from an Afro-Colombian community:

presence of HBV F3/A1 recombinant strain[J]. *Virol J*, 2012, 24(9):244.

[6] 吴光华,丁惠国,曾长青. 公共核酸数据库乙肝病毒全基因组序列概况和中国 HBV 参照序列的建立[J]. *自然科学进展*, 2008, 18(2), 121-129.

[7] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6):324-329.

[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, 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):59-62.

[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:2016-06-02 修回日期:2016-07-22)

(上接第 3265 页)

management costs in the United States[J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29(2):192-195.

[12] Finfer S, Chittock DR, Li Y, et al. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(13):1283-1297.

[13] Maranduba CM, De Castro SB, de Souza GT, et al. Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis[J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015:1-10.

[14] Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders[J]. *Brain Behav Immun*, 2014,

38(5):1-12.

[15] 谢强,曹明杰,陈玲,等. 2013 年血培养病原菌分布与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(12):2687-2688.

[16] Bassetti M, Peghin M, Pecori D. The management of multidrug-resistant enterobacteriaceae [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2016, 29(1):1-9.

[17] 翟群超,叶山东,黄海泉,等. 2 型糖尿病合并血流感染的病原菌分布及耐药性分析[J]. *中国糖尿病杂志*, 2015, 23(12):1084-1087.

(收稿日期:2016-06-26 修回日期:2016-09-08)