

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610135351.9

[51] Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/51 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月15日

[11] 公开号 CN 101016536A

[51] Int. Cl. (续)

C12Q 1/04 (2006.01)

[22] 申请日 2006.12.21

[21] 申请号 200610135351.9

[71] 申请人 福建医科大学

地址 350004 福建省福州市交通路 88 号福建
医科大学

[72] 发明人 林旭 黄清玲 柏世玉 林建银

权利要求书 9 页 说明书 17 页 附图 3 页

[54] 发明名称

乙型肝炎病毒细胞株 HepG2 - RHBV 的构建

[57] 摘要

本发明公开了一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2 - RHBV 的构建，属人体疾病的预防与治疗的前期研究。本发明构建能稳定表达 HBV 相关抗原并复制的 HepG2 细胞株，作为模板的 HBV DNA 以重组 DNA 方式游离于细胞染色体外；以 HepG2 - RHBV 细胞株应用于抗 HBV 药物的筛选；以构建的 HepG2 - RHBV 细胞株为基础，进一步研究 HBV 对 HepG2 细胞的影响。由于本发明构建 HBV 自主复制的肝细胞株，使 HBV 在 HepG2 细胞中不仅能长期复制、表达特异性抗原及产生病毒颗粒，而且作为模板的 HBV DNA 以重组 DNA 方式游离于细胞染色体外，从而研究 HBV 对 HepG2 细胞的总体影响，分析 HBV 的可能致病机制，为临床治疗提供指导和依据。

1、一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的构建，其特征是：

(一) 试剂：

p56 为 pUC18 重组载体，含全基因组 HBV DNA，HBV DNA 的 preS2 起始密码由 CTG 定点突变成 ATG；HepG2 细胞及 HepG2.2.15 细胞，均以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养；

(二) 构建1.2倍体HBV DNA重组真核表达载体

(1) 片段 A 的获取

以引物 TBf 和 TBr 从质粒 pSEAP2- Basic 中扩增 0.1Kb 的 TB 片段 Transcription Blocker，总体积为 50ul，用 ABI 9700 PCR 扩增仪扩增，采用热启动方式，待温度上升至 94°C 后加入聚合酶，反应经 94°C 预变性 2 分钟后进入循环，循环结束后 72°C 延伸 7 分钟；PCR 产物与 0.2 倍体积的 6×DNA 上样缓冲液混匀后上样，1.5%琼脂糖凝胶，0.5×TBE 电泳缓冲液，稳压 120V，电泳 30 分钟；在紫外灯下将含目的基因片段的琼脂糖凝胶切下，置离心管中，用胶回收试剂盒回收 DNA 片段，每 100mg 琼脂糖凝胶加入 300μl Solution I，65°C 水浴 10 分钟，每隔两分钟颠倒一次，使胶完全溶解；混合液移入吸附柱中，10000 g 离心 1 分钟，弃去收集管中的液体；吸附柱中加入 500μl Solution II，10000 g 离心 1 分钟，弃去收集管中的液体；再以 solution II 液重复洗柱一次；空柱 10000 g 离心 2 分钟，将吸附柱置 1.5ml 离心管中，开盖放置 2 分钟使乙醇完全挥发，往吸附柱中央加入 25μl 灭菌双蒸水，室温静置 5 分钟后 10000 g 离心 1 分钟洗脱 DNA；

PCR 回收产物以 Sal I、BamH I 酶切，反应体系 20μl，37°C 水浴 16h，酶消化产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后回收，该片段记为 A；

(2) 片段 B 的获取

以 Sap I 完全酶切 p56-mut，反应体系 100μl，37°C 水浴 16h，酶消化产物

经 0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收 3.2kb 的片段即完整的全基因组 HBV DNA；回收产物进行自身连接，反应体系 20 μ l， 4 $^{\circ}$ C 连接 24h，连接产物用 DNA 纯化试剂盒纯化，加入 250 μ l Solution I，混合液移入吸附柱中，10000 g 离心 1 分钟，弃去收集管中的液体；吸附柱中加入 500 μ l Solution II，10000 g 离心 1 分钟，弃去收集管中的液体；再以 solution II 液重复洗柱一次；空柱 10000 g 离心 2 分钟，将吸附柱置 1.5ml 离心管中，开盖放置 3 分钟使乙醇完全挥发，往吸附柱中央加入 25 μ l 灭菌双蒸水，室温静置 5 分钟后 10000 g 离心 1 分钟洗脱 DNA；获得的环状 HBV DNA 记为#56-mut HBV DNA，以 BamH I 和 Xba I 双酶切，反应体积 20 μ l， 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h，酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后回收约 2.0Kb 片段，该片段记为 B；

(3) 片段 C 的获取

以 Xba I 和 Rsr II 双酶切 p56-mut，反应体积 20 μ l， 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h，酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后胶回收试剂盒回收 1.3Kb 片段，该片段记为 C；

(4) 片段 D 的获取

用引物 PC 和 PD 从#56-mut HBV DNA 中扩增 0.6 Kb DNA，总体积为 50 μ l；PCR 扩增条件同前，1.5%琼脂糖凝胶电泳后胶回收试剂盒回收约 0.6 Kb 片段，并以 Rsr II 酶切，反应体积 20 μ l；37 $^{\circ}$ C 水浴 16h，酶消化产物经 DNA 纯化试剂盒纯化，纯化产物用 SalI 酶切，反应体积 20 μ l； 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h，酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后胶回收试剂盒回收约 0.4Kb 片段，该片段记为 D；

(5) pREP10 载体的酶切

以 Sal I 切除 pREP10 载体上的真核表达盒相关片段，包括 CMV 启动子、多克隆位点、SV40 加尾信号，反应体积 20 μ l；37 $^{\circ}$ C 水浴 16h，酶消化产物经 0.75%琼脂糖凝胶电泳后胶回收试剂盒回收约 8.2 Kb 载体片段；

(6) 目的片段与载体的连接及转化

以 Sal I 切除 pREP10 载体后回收的 8.2 Kb 载体片段与 A-D 四个片段连接, 构建重组载体 pREP-HBV, 反应体积 30 μ l, 4°C 连接 24h, 将连接产物加入 100 μ l 感受态 Top10 细菌, 冰浴 30 分钟, 42°C 热休克 2 分钟, 快速置冰浴 2 分钟, 加入 0.8ml LB 培养液, 37°C、300rpm/分钟摇育 45 分钟; 4000 g 离心 2 分钟收集细菌, 将细菌涂布于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的琼脂平板上, 置于 37°C 温箱孵育 16 小时;

(7) 筛选重组克隆

氨苄青霉素琼脂平板上挑取菌落, 转种于 5ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37°C、300rpm/分钟摇育 8 小时; 取 1.5ml 菌液用质粒小量抽提试剂盒提取质粒, 4000g 离心 2 分钟收集细菌, 加入 250 μ l Solution I (25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA) 震荡重悬细菌, 加入 250 μ l Solution II (0.2N NaOH, 1%SDS), 颠倒混匀至菌液变清, 加入 350 μ l Solution III(3M KAc, pH5.5), 混匀; 12000 g 离心 10 分钟, 上清移入吸附柱内, 12000 g 离心 1 分钟, 弃收集管内的液体, 加入 500 μ l SolutionIV, 12000 g 离心 1 分钟, 弃收集管内的液体, 加入 650 μ l Solution V, 10000g 离心 1 分钟, 弃收集管内的液体, 同法重复洗柱一次, 弃收集管内的液体, 空柱 12000 g 离心 2 分钟; 在吸附柱中央加入 30 μ l 灭菌三蒸水, 12000 g 离心 1 分钟洗脱质粒 DNA, 该质粒记为 pREP-HBV;

pREP-HBV 质粒含 A-D 四个外源 DNA 片段: A 为扩增自 pSEAP2- Basic 载体的 TB (Transcription Blocker) 片段; B、C、D 共同组成 1.2 倍体 HBV DNA, 由此构成一个完整的 HBV 转录单位, 其中 B 片段位于 HBV 基因组 1402nt-249nt, 其 5' 端含 HBV 的核心启动子 (Basic Core promoter, BCP), C 片段位于 HBV 基因组 249nt- 1573nt, D 片段位于 HBV 基因组 1573nt-2000nt, 其 3' 端含加尾

信号；取 5 μ l 质粒 DNA，以 Sal I 酶切，反应体积为 20 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴 5 小时，产物以 1%的琼脂糖凝胶电泳；pREP-HBV 经 Sal I 酶切出现两条 DNA 带，分别为 8.2kb 和 3.9kb，后者由 1.2 倍体 HBV DNA（3.8Kb）及 TB 片段（0.1Kb）组成；经 BamH I 酶切后，在 8.9kb 和 3.2kb 处可见两条 DNA 带，后者为 1 单位长度的 HBV DNA；上述酶切结果与预期符合；相关序列以 ABI3730 型 DNA 自动荧光序列分析仪进行序列测定，测序引物如下：

P1: 5' AGACCACCAAATGCCCCTATC 3'

P2: 5' GGGTCACCATATTCTTGGGAAC 3'

P3: 5' CTCCGCGAGGACTGGGGACCC 3'

P4: 5' GCCATTTGTTCAGTGGTTCG 3'

P5: 5' CGCATGCGTGGAACCTTTGTG 3'

PCR: 5'AAGCCCAGTAAAGTTTCCCAC 3'

Rep10-7: 5' GTTGTACCAACCAACTGAAG 3'

Reo10-1087: 5' GTCCACGACTGGACTGAGCAG 3'

（三）质粒DNA抽提、定量及DNA转染

以 Qiagen Plasmid Midi Kits 大量抽提 pREP-HBV 质粒；菌株按 1:100 接种至 500ml LB 培养液(含氨苄青霉素 100 μ g/ml)，37 $^{\circ}$ C 震荡培养 16 小时；4000 g 离心 10 分钟收集细菌，加入 10ml P1 液，震荡重悬菌体；加入 10ml P2 液裂解细菌，置室温 3 分钟，使菌体完全裂解；加入 10ml P3 液，颠倒混合，冰浴 20 分钟；20000 g 离心 30 分钟，收集上清液体缓慢注入已用 10ml QBT 缓冲液平衡的 Qiagen-tip500 纯化柱，待滴完后用 30ml QC 缓冲液洗柱两次，后用 15ml QF 缓冲液洗脱 DNA；洗脱液中加入 10.5ml 异丙醇，20000g 离心 30 分钟，以 5ml 70% 乙醇漂洗 DNA 沉淀，42 $^{\circ}$ C 温箱中干燥 5 分钟后，将 DNA 溶于 500 μ l 灭菌三蒸水；取所获 DNA 10 μ l，以紫外分光光度计测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 及比值，确定浓度为 0.459 μ g/ μ l，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.968；

HepG2 细胞以含 10%小牛血清的 DMEM 培养 HepG2 细胞，传代之前以 0.25%胰酶、0.1%EDTA 进行消化，按 6×10^5 细胞 / 孔，接种至 6 孔细胞培养板；20 小时后，换新鲜的培养液(此时平皿中细胞覆盖已达 80-90%)，4 小时后进行转染；将 Qiagen 试剂盒大量抽提的质粒 pREP-HBV，以 Lipofectamine2000 转染细胞；转染的质粒 DNA 量与 Lipofectamine2000 用量比例为 $1\mu\text{g}: 2\mu\text{l}$ ；转染 16 小时后加入 $250\mu\text{g/ml}$ 潮霉素筛选，每 3d 换培养液一次（含潮霉素），约 3 周后形成抗潮霉素细胞集落，挑取细胞集落置 24 孔板，继续用含潮霉素的培养液培养、扩增、冻存。

2、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的以引物 TBf 和 TBr 从质粒 pSEAP2- Basic 中扩增 0.1Kb 的 TB 片段用 ABI 9700 PCR 扩增仪扩增，采用热启动方式，待温度上升至 94°C 后加入聚合酶，反应经 94°C 预变性 2 分钟后进入循环，即 94°C 变性 30 秒， 55°C 退火 30 秒， 72°C 延伸 30 秒，扩增 30 个循环。

3、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的 PCR 回收产物以 Sal I、BamH I 酶切，反应体系 $20\mu\text{l}$ ，成份如下：PCR 回收产物 $14\mu\text{l}$ ($0.5\mu\text{g}$)， $10 \times$ BamH I Buffer $2\mu\text{l}$ ， $10 \times$ BSA $2\mu\text{l}$ ，BamH I $1\mu\text{l}$ (20U)，Sal I $1\mu\text{l}$ (20U)，共 $20\mu\text{l}$ 。

4、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的以 Sap I 完全酶切 p56-mut，反应体系 $100\mu\text{l}$ ，成份如下：p56-mut $60\mu\text{l}$ ($10\mu\text{g}$)， $10 \times$ Buffer4 $10\mu\text{l}$ ，Sap I $5\mu\text{l}$ (10U)，ddH₂O $25\mu\text{l}$ ，共 $100\mu\text{l}$ 。

5、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的引物 TBf: 5'ACGCGTCGACAAATAAAATATCTTTATTTTC 3' 下划线为 Sal I 酶切位点；TBr: 5'CGCGGATCCAGAGAAATGTTCTGGCACC 3'

下划线为 BamH I 酶切位点。

6、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的引物 TBf 和 TBr 从质粒 pSEAP2- Basic 中扩增 0.1Kb 的 TB 片段，总体积为 50ul，反应体系如下：10×High Fidelity PCR Buffer 5μl，10mM dNTP mixture 1μl (0.2mM each)，50mM MgSO₄ 2μl (2mM)，TBf(10μM) 1μl (0.2μM)，TBr(10μM) 1μl (0.2μM)，pSeap2-Basic(10μg/μl) 1μl (10μg)，Platinum Taq High Fidelity 0.2μl (1.0U)，ddH₂O 38.8μl，共 50μl。

7、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的以 Sap I 完全酶切 p56-mut，反应体系 100μl，37°C 水浴 16h，酶消化产物经 0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收 3.2kb 的片段即完整的全基因组 HBV DNA；回收产物进行自身连接，反应体系 20μl，成份如下：酶切回收产物 17μl (5μg)，10×Ligase Buffer 2μl，Ligase 1μl(1U)，共 20μl。

8、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的环状 HBV DNA 记为#56-mut HBV DNA，以 BamH I 和 Xba I 双酶切，反应体积 20 μl，体系如下：#56-mut HBV DNA 14μl (0.5μg)，10×Buffer 2 μl，10×BSA 2μl，BamH I 1μl(20U)，Xba I 1μl(20U)，共 20μl。

9、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的以 Xba I 和 Rsr II 双酶切 p56-mut，反应体积 20 μl，体系如下：p56-mut 4μl (0.5μg)，10×Buffer 2 μl，10×BSA 2μl，Rsr II 1μl(4U)，Xba I 1μl(20U)，ddH₂O 10μl，共 20μl。

10、根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的引物 PC:5'CATTTCATGGCTGCTAGGC 3'，PD:5'ACGCGTCGACGAGA TCTCGAATAGAAGGAAAG 3'，下划线为 Sal I 酶切位

点。

11、根据权利要求1所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的引物 PC 和 PD 从#56-mut HBV DNA 中扩增 0.6 Kb DNA，总体积为 50 μ l，反应体系如下：10 \times High Fidelity PCR Buffer 5 μ l，10mM dNTP mixture 1 μ l (0.2mM each)，50mM MgSO₄ 2 μ l (2mM)，PC(10 μ M) 1 μ l (0.2 μ M)，PD(10 μ M) 1 μ l (0.2 μ M)，#56-mut HBV DNA (0.12 μ g/ μ l) 1 μ l (0.12 μ g)，Platinum Taq High Fidelity 0.2 μ l (1.0U)，ddH₂O 38.8 μ l，共 50 μ l；PCR 扩增条件同前，1.5%琼脂糖凝胶电泳后胶回收试剂盒回收约 0.6 Kb 片段，并以 Rsr II 酶切，反应体积 20 μ l；体系如下：PCR 回收产物 17 μ l (1.5 μ g)，10 \times Buffer4 2 μ l，Rsr II 1 μ l(4U)，共 20 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴 16h，酶消化产物经 DNA 纯化试剂盒纯化，纯化产物用 SalI 酶切，反应体积 20 μ l，体系如下：纯化产物 15 μ l (0.5 μ g)，10 \times Sal I Buffer 2 μ l，10 \times BSA 2 μ l，Sal I 1 μ l(20U)，共 20 μ l。

12、根据权利要求1所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的以 Sal I 切除 pREP10 载体上的真核表达盒相关片段，反应体积 20 μ l，体系如下：pREP10 2 μ l (0.5 μ g)，10 \times Sal I Buffer 2 μ l，10 \times BSA 2 μ l，Sal I 1 μ l(20U)，ddH₂O 13 μ l，共 20 μ l。

13、根据权利要求1所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的以 Sal I 切除 pREP10 载体后重组载体 pREP-HBV，反应体积 30 μ l，体系如下：载体片段 4 μ l，10 \times Ligase Buffer 3 μ l，Ligase 3 μ l(3U)，片段 A 5 μ l，片段 B 5 μ l，片段 C 5 μ l，片段 D 5 μ l，共 30 μ l。

14、根据权利要求1所述的一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的建立，其特征是：所述的 5 μ l 质粒 DNA，以 Sal I 酶切，反应体积为 20 μ l，体系如下：pREP-HBV DNA 5 μ l (0.5 μ g)，10 \times Sal I Buffer 2 μ l，10 \times BSA 2 μ l，Sal I 1 μ l (20U)，

ddH₂O 10 μ l, 共 20 μ l。

15、乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的检测：其特征是：

(1) HBsAg及HBeAg检测

以Lipofectamine2000将pREP-HBV重组体转染HepG2细胞并以潮霉素筛选，获得抗性克隆，命名为HepG2-RHBV。扩增细胞，收集第5、10、20、30、40代潮霉素抗性细胞培养上清，用ELISA法检测HBV 特异抗原HBeAg、HBsAg的表达情况；

(2) 细胞内 HBV 病毒颗粒 DNA 的提取及 Southern 印迹检测 HBV DNA

潮霉素抗性细胞接种在 60mm 平皿中，每皿细胞量为 1.8×10^6 ，培养 3d 后的细胞以冰预冷的 PBS 洗 2 遍；以裂解液裂解细胞，离心后保留上清，加入 35 %PEG8000/1.75mol/L NaCl 浓缩裂解液中的 HBV 核心颗粒，并以 DNase I、RNase A 处理，以确保完全降解可能残留的 pREP-HBV。病毒核心颗粒以 SDS/蛋白酶 K 消化 12h，饱和酚、酚/氯仿各抽提 1 次，乙醇沉淀病毒 DNA 并溶于 20 μ l 去离子水；提取的 HBV DNA 于 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离，常规虹吸转移至尼龙膜；以随机引物法制备探针，所用模板为全长 HBV DNA，以 ³²P-dCTP 标记；

(3) 电镜检测HBV颗粒

取潮霉素抗性细胞培养上清液约 20ml，8000rpm，离心 30min，取上清；在超速离心管底部先加入 1ml TNE 垫液 10mM Tris, pH7.4, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 20% Sucrose, 缓慢注入上述离心后的上清，经 40 000 rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 5 h，弃上清，沉淀加入 50 μ l PBS 重悬后作磷钨酸负染，在电镜下检查病毒颗粒情况，可见成簇的直径约为 42 nm 左右的 HBV 样颗粒以及直径为 22~26 nm 的球形颗粒。

16、根据权利要求 15 所述的乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的检测：
其特征是：裂解液为 10mM Tris, pH 7.9, 1mM EDTA, 50mM NaCl, 1% NP40, 8%
蔗糖。

乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的构建

技术领域

本发明涉及人体疾病的预防与治疗的前期研究，具体的说是一种为临床治疗提供指导和依据的乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的构建。

背景技术

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种部分双链环状嗜肝 DNA 病毒，是迄今为止已发现的最小的 DNA 病毒，约 3.2Kb，含 4 个开放读码框 (ORF)，即 Pre-S/S、Pre-C/C、Pol 和 X ORF，分别编码表面抗原 (包括大、中、小表面抗原)、核心/e 蛋白、DNA 聚合酶及 X 蛋白。Pol ORF 最长，Pre-S/S ORF 完全与 Pol ORF 重叠，Pre-C/C ORF 和 X ORF 也部分与 Pol ORF 重叠。HBV 主要宿主是人类，具有高度种属和组织特异性，宿主范围狭窄。HBV 可引起急慢性乙型肝炎，肝纤维化，并与原发性肝细胞癌的发生发展关系密切。

乙型肝炎的临床表现呈多样化，可由无症状携带者至急性肝炎、慢性肝炎、重症肝炎等，普遍认为 HBV 在肝细胞中增殖不会引起直接的肝细胞损伤，针对存在肝细胞表面的 HBV 抗原所引起宿主的细胞免疫应答，是肝细胞损伤的决定性因素。近来研究表明 HBV 的编码产物具有直接的致病作用。美国学者 Foo 等人发现，HBV 表面抗原大蛋白可引起 Huh7 肝细胞空泡化和凋亡，提示 HBV 表面抗原大蛋白本身具有肝细胞致病性。此外 X 蛋白 (HBx) 是乙型肝炎病毒相关性肝细胞疾病最重要的致病因子之一，与 HCC 的发生、发展密切相关。HBx 可激活 HBV 基因组转录，促进 HBV 复制；活化 AP-1、NF- κ B 等转录因子，促进肝细胞原癌基因的转录，影响细胞生长周期，增强肿瘤细胞侵袭转移能力等。除正常的基因编码产物外，乙型肝炎病毒还可因基因组剪接产生新蛋白。现已证实某些 HBV 基因组剪接变异体产生的新蛋白具有肝细胞致病性，如诱导肝细胞

凋亡，加重肝炎病情等。

目前，关于 HBV 编码蛋白功能的研究越来越多，但多是单组分研究，HBV 对宿主的整体影响尚鲜见报道。事实上，HBV 感染宿主细胞后的致病性是其各编码蛋白共同作用的总体结果，细胞模型和动物模型是研究 HBV 的主要途径，动物模型中黑猩猩是公认的 HBV 感染模型，由于黑猩猩数量有限，来源困难，价格昂贵，在实验中的应用有很大的困难。因此有学者试图寻找其它的动物模型，目前已有转 X、S、C 基因的转基因动物，这些部分片段转基因小鼠模型仅表达单一基因产物，不能产生病毒，不适宜研究病毒复制。HBV 全长的转基因小鼠均不能检测到细胞内 cccDNA。建立 HBV 细胞株是从整体水平研究 HBV 致病机制的重要途径。1986 年美国学者 Sells MA 等用重组载体 pDoLT-HBV-1（含 2 个 HBV 头对尾二聚体，以尾对尾方向串联）转染 HepG2 细胞，经 G418 筛选，获得能够复制 HBV 的细胞克隆，即 HepG2.2.15，是目前广泛使用的 HBV 细胞株，但在该细胞中 HBV DNA 整合于染色体上，其复制与转录可能受到其它启动子的影响，与 HBV 自然感染状态不同；由于缺乏严格的对照，在 HBV 功能研究中的应用受到了很大的限制。为此，本研究拟采用新策略构建 HBV 肝细胞株，使 HBV 在 HepG2 细胞中不仅能长期复制、表达特异性抗原及产生病毒颗粒，而且作为模板的 HBV DNA 以重组 DNA 方式游离于细胞染色体外，从而进一步研究 HBV 对 HepG2 细胞的总体影响，分析 HBV 的可能致病机制。

从包括中国专利在内的有关资料检索表明，目前尚未见到乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的构建的相关报道。

发明内容

为了克服现有技术的不足，本发明的目的是要：

1. 构建能稳定表达 HBV 相关抗原并复制的 HepG2 细胞株，该细胞株中

HBV 不仅能长期复制、表达特异性抗原及产生病毒颗粒，而且作为模板的 HBV DNA 以重组 DNA 方式游离于细胞染色体外。

2. 以 HepG2-HBV 细胞株应用于抗 HBV 药物的筛选。

3. 以构建的 HepG2-HBV 细胞株为基础，进一步研究 HBV 对 HepG2 细胞的总体影响，分析 HBV 的致病机制，为临床治疗提供指导和依据。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：一种乙型肝炎病毒细胞株 HepG2-RHBV 的构建，其特征是：

1、试剂：

p56 为 pUC18 重组载体，含全基因组 HBV DNA，HBV DNA 的 preS2 起始密码由 CTG 定点突变成 ATG；HepG2 细胞及 HepG2.2.15 细胞购自 ATCC，均以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养。

真核表达载体 pREP10、DMEM、Lipofectamine2000 培养基及小牛血清购自 Invitrogen 公司；Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity 购自 Invitrogen 公司；限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司；蛋白酶 K 购自 Merck 公司；潮霉素 (Hygromycin)、DNase I、RNase A、DNA 探针标记试剂盒 (Random primer DNA labeling kit) 购自 Roche 公司；pSEAP2- Basic 载体购自 Clontech 公司；胶回收及质粒小量抽提试剂盒购自 Promega 公司；质粒大量抽提试剂盒购自 Qiagen 公司；HBsAg、HBeAg ELISA 检测试剂盒购自上海科华生物公司、³²P-dCTP 购自北京亚辉公司。

2、构建1.2倍体HBV DNA重组真核表达载体

(1) 片段 A 的获取

以引物 TBf 和 TBr (TBf: 5'ACGCGTCGACAATAAAAATATCTTTATTTTC
3'下划线为 Sal I 酶切位点, TBr: 5'CGCGGATCCAGAGAAATGTTCTGGCACC
3'下划线为 BamH I 酶切位点) 从质粒 pSEAP2- Basic 中扩增 0.1Kb 的 TB 片段

(Transcription Blocker), 总体积为 50 μ l, 反应体系如下: 10 \times High Fidelity PCR Buffer 5 μ l, 10mM dNTP mixture 1 μ l (0.2mM each), 50mM MgSO₄ 2 μ l (2mM), Tbf(10 μ M) 1 μ l (0.2 μ M), TBr(10 μ M) 1 μ l (0.2 μ M), pSeap2-Basic(10 μ g/ μ l) 1 μ l (10 μ g), Platinum *Taq* High Fidelity 0.2 μ l (1.0U), ddH₂O 38.8 μ l, 共 50 μ l。用 ABI 9700 PCR 扩增仪扩增, 采用热启动方式, 待温度上升至 94 $^{\circ}$ C 后加入聚合酶, 反应经 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟后进入循环, 即, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒, 扩增 30 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟; PCR 产物与 0.2 倍体积的 6 \times DNA 上样缓冲液混匀后上样, 1.5%琼脂糖凝胶, 0.5 \times TBE 电泳缓冲液, 稳压 120V, 电泳 30 分钟; 在紫外灯下将含目的基因片段的琼脂糖凝胶切下, 置离心管中, 用胶回收试剂盒回收 DNA 片段, 每 100mg 琼脂糖凝胶加入 300 μ l Solution I, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟, 每隔两分钟颠倒一次, 使胶完全溶解。混合液移入吸附柱中, 10000 g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体; 吸附柱中加入 500 μ l Solution II, 10000 g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体; 同法以 solution II 液重复洗柱一次; 空柱 10000 g 离心 2 分钟, 将吸附柱置 1.5ml 离心管中, 开盖放置 2 分钟使乙醇完全挥发, 往吸附柱中央加入 25 μ l 灭菌双蒸水, 室温静置 5 分钟后 10000 g 离心 1 分钟洗脱 DNA。

PCR 回收产物以 Sal I、BamH I 酶切, 反应体系 20 μ l, 成份如下: PCR 回收产物 14 μ l (0.5 μ g), 10 \times BamH I Buffer 2 μ l, 10 \times BSA 2 μ l, BamH I 1 μ l(20U), Sal I 1 μ l(20U), 共 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h, 酶消化产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后回收(方法同前), 该片段记为 A。

(2) 片段 B 的获取

以 Sap I 完全酶切 p56-mut, 反应体系 100 μ l, 成份如下: p56-mut 60 μ l (10 μ g), 10 \times Buffer4 10 μ l, Sap I 5 μ l(10U), ddH₂O 25 μ l, 共 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴

16h, 酶消化产物经 0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收 3.2kb 的片段即完整的全基因组 HBV DNA (方法同前); 回收产物进行自身连接, 反应体系 20 μ l, 成份如下: 酶切回收产物 17 μ l (5 μ g), 10 \times Ligase Buffer 2 μ l, Ligase 1 μ l(1U), 共 20 μ l, 4 $^{\circ}$ C 连接 24h, 连接产物用 DNA 纯化试剂盒纯化, 加入 250 μ l Solution I, 混合液移入吸附柱中, 10000 g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体; 吸附柱中加入 500 μ l Solution II, 10000 g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体; 同法以 solution II 液重复洗柱一次; 空柱 10000 g 离心 2 分钟, 将吸附柱置 1.5ml 离心管中, 开盖放置 2-3 分钟使乙醇完全挥发, 往吸附柱中央加入 25 μ l 灭菌双蒸水, 室温静置 5 分钟后 10000 g 离心 1 分钟洗脱 DNA; 获得的环状 HBV DNA 记为#56-mut HBV DNA, 以 BamH I 和 Xba I 双酶切, 反应体积 20 μ l, 体系如下:#56-mut HBV DNA 14 μ l (0.5 μ g), 10 \times Buffer2 2 μ l, 10 \times BSA 2 μ l, BamH I 1 μ l(20U), Xba I 1 μ l(20U), 共 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h, 酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后回收约 2.0Kb 片段(方法同前), 该片段记为 B。

(3) 片段 C 的获取

以 Xba I 和 Rsr II 双酶切 p56-mut, 反应体积 20 μ l, 体系如下: p56-mut 4 μ l (0.5 μ g), 10 \times Buffer4 2 μ l, 10 \times BSA 2 μ l, Rsr II 1 μ l(4U), Xba I 1 μ l(20U), ddH₂O 10 μ l, 共 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h, 酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后回收试剂盒回收约 1.3Kb 片段, 该片段记为 C。

(4) 片段 D 的获取

用引物 PC 和 PD (PC:5'CATTTCCATGGCTGCTAGGC 3', PD:5'ACGCGTCGACGAGA TCTCGAATAGAAGGAAAG 3',下划线为 Sal I 酶切位点) 从#56-mut HBV DNA 中扩增 0.6 Kb DNA, 总体积为 50 μ l, 反应体系如下: 10 \times High Fidelity PCR Buffer 5 μ l, 10mM dNTP mixture 1 μ l (0.2mM each), 50mM

MgSO₄ 2μl (2mM), PC(10μM) 1μl (0.2μM), PD(10μM) 1μl (0.2μM), #56-mut HBV DNA (0.12μg/μl) 1μl (0.12μg), Platinum Taq High Fidelity 0.2μl (1.0U), ddH₂O 38.8μl, 共 50μl, PCR 扩增条件同前, 1.5%琼脂糖凝胶电泳后胶回收试剂盒回收约 0.6 Kb 片段, 并以 Rsr II 酶切, 反应体积 20 μl, 体系如下: PCR 回收产物 17μl (1.5μg), 10×Buffer4 2μl, Rsr II 1μl(4U), 共 20μl, 37°C 水浴 16h, 酶消化产物经 DNA 纯化试剂盒纯化, 纯化产物用 SalI 酶切, 反应体积 20 μl, 体系如下: 纯化产物 15μl (0.5μg), 10×Sal I Buffer 2μl, 10×BSA 2μl, Sal I 1μl(20U), 共 20μl, 37°C 水浴 16h, 酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后胶回收试剂盒回收约 0.4Kb 片段, 该片段记为 D。

(5) pREP10 载体的酶切

以 Sal I 切除 pREP10 载体上的真核表达盒相关片段, 包括 CMV 启动子、多克隆位点、SV40 加尾信号等, 反应体积 20 μl, 体系如下: pREP10 2μl (0.5μg), 10×Sal I Buffer 2μl, 10×BSA 2μl, Sal I 1μl(20U), ddH₂O 13μl, 共 20μl, 37°C 水浴 16h, 酶消化产物经 0.75%琼脂糖凝胶电泳后胶回收试剂盒回收约 8.2 Kb 载体片段。

(6) 目的片段与载体的连接及转化

以 Sal I 切除 pREP10 载体后回收的 8.2 Kb 载体片段与上述 A-D 四个片段连接, 构建重组载体 pREP-HBV, 反应体积 30 μl, 体系如下: 载体片段 4μl, 10×Ligase Buffer 3μl, Ligase 3μl(3U), 片段 A 5μl, 片段 B 5μl, 片段 C 5μl, 片段 D 5μl, 共 30μl, 4°C 连接 24h, 将连接产物加入 100μl 感受态 Top10 细菌, 冰浴 30 分钟, 42°C 热休克 2 分钟, 快速置冰浴 2 分钟, 加入 0.8ml LB 培养液, 37°C、300rpm/分钟摇育 45 分钟; 4000 g 离心 2 分钟收集细菌, 将细菌涂布于含 100μg/ml 氨苄青霉素的琼脂平板上, 置于 37°C 温箱孵育 16 小时。

(7) 筛选重组克隆

氨苄青霉素琼脂平板上挑取菌落,转种于 5ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、300rpm/分钟摇育 8 小时; 取 1.5ml 菌液用质粒小量抽提试剂盒提取质粒, 4000g 离心 2 分钟收集细菌, 加入 250 μ l Solution I (25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA) 震荡重悬细菌, 加入 250 μ l Solution II (0.2N NaOH, 1%SDS), 颠倒混匀至菌液变清, 加入 350 μ l Solution III(3M KAc, pH5.5), 混匀; 12000 g 离心 10 分钟, 上清移入吸附柱内, 12000 g 离心 1 分钟, 弃收集管内的液体, 加入 500 μ l SolutionIV, 12000 g 离心 1 分钟, 弃收集管内的液体, 加入 650 μ l Solution V, 10000g 离心 1 分钟, 弃收集管内的液体, 同法重复洗柱一次, 弃收集管内的液体, 空柱 12000 g 离心 2 分钟; 在吸附柱中央加入 30 μ l 灭菌三蒸水, 12000 g 离心 1 分钟洗脱质粒 DNA, 该质粒记为 pREP-HBV。

pREP-HBV 质粒含 A-D 四个外源 DNA 片段: A 为扩增自 pSEAP2- Basic 载体的 TB (Transcription Blocker) 片段; B、C、D 共同组成 1.2 倍体 HBV DNA, 由此构成一个完整的 HBV 转录单位, 其中 B 片段位于 HBV 基因组 1402nt-249nt, 其 5' 端含 HBV 的核心启动子 (Basic Core promoter, BCP), C 片段位于 HBV 基因组 249nt- 1573nt, D 片段位于 HBV 基因组 1573nt-2000nt, 其 3' 端含加尾信号; 取 5 μ l 质粒 DNA, 以 Sal I 酶切, 反应体积为 20 μ l, 体系如下: pREP-HBV DNA 5 μ l (0.5 μ g), 10 \times Sal I Buffer 2 μ l, 10 \times BSA 2 μ l, Sal I 1 μ l (20U), ddH₂O 10 μ l, 共 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 小时, 产物以 1%的琼脂糖凝胶电泳。pREP-HBV 经 Sal I 酶切出现两条 DNA 带, 分别为 8.2kb 和 3.9kb, 后者由 1.2 倍体 HBV DNA (3.8Kb) 及 TB 片段 (0.1Kb) 组成; 经 BamH I 酶切后, 在 8.9kb 和 3.2kb 处可见两条 DNA 带, 后者为 1 单位长度的 HBV DNA; 上述酶切结果与预期符合; 相关序列以 ABI3730 型 DNA 自动荧光序列分析仪进行序列测定, 测序引物如下:

P1: 5' AGACCACCAAATGCCCCTATC 3'
P2: 5' GGGTCACCATATTCTTGGGAAC 3'
P3: 5' CTCCGCGAGGACTGGGGACCC 3'
P4: 5' GCCATTTGTTTCAGTGGTTCG 3'
P5: 5' CGCATGCGTGGAACCTTTGTG 3'
PCR: 5' AAGCCCAGTAAAGTTTCCCAC 3'
Rep10-7: 5' GTTGTACCAACCAACTGAAG 3'
Reo10-1087: 5' GTCCACGACTGGACTGAGCAG 3'

测序结果证实 1.2 倍体 HBV DNA (3.8Kb) 与原模板序列完全一致。

3、质粒DNA抽提、定量及DNA转染

以 Qiagen Plasmid Midi Kits 大量抽提 pREP-HBV 质粒；菌株按 1:100 接种至 500ml LB 培养液(含氨苄青霉素 100 μ g/ml)，37 $^{\circ}$ C 震荡培养 16 小时；4000 g 离心 10 分钟收集细菌，加入 10ml P1 液，震荡重悬菌体；加入 10ml P2 液裂解细菌，置室温 3 分钟，使菌体完全裂解。加入 10ml P3 液，颠倒混合，冰浴 20 分钟；20000 g 离心 30 分钟，收集上清液体缓慢注入已用 10ml QBT 缓冲液平衡的 Qiagen-tip500 纯化柱，待样品滴完后用 30ml QC 缓冲液洗柱两次，后用 15ml QF 缓冲液洗脱 DNA；洗脱液中加入 10.5ml 异丙醇，20000g 离心 30 分钟，以 5ml 70%乙醇漂洗 DNA 沉淀，42 $^{\circ}$ C 温箱中干燥 5 分钟后，将 DNA 溶于 500 μ l 灭菌三蒸水；取所获 DNA 10 μ l，以紫外分光光度计测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 及比值，确定浓度为 0.459 μ g/ μ l，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.968。

HepG2 细胞以含 10%小牛血清的 DMEM 培养 HepG2 细胞，传代之前以 0.25%胰酶、0.1%EDTA 进行消化，按 6×10^5 细胞 / 孔，接种至 6 孔细胞培养板；20 小时后，换新鲜的培养液(此时平皿中细胞覆盖已达 80-90%)，4 小时后进行转染；将 Qiagen 试剂盒大量抽提的质粒 pREP-HBV，以 Lipofectamine2000 转染细胞；转染的质粒 DNA 量与 Lipofectamine2000 用量比例为 1 μ g: 2 μ l；转染 16

小时后加入 250 μ g/ml 潮霉素筛选，每 3d 换培养液一次（含潮霉素），约 3 周后形成抗潮霉素细胞集落，挑取细胞集落置 24 孔板，继续用含潮霉素的培养液培养、扩增、冻存。

本发明的检测：

1、HBsAg及HBeAg检测

以Lipofectamine2000将pREP-HBV重组体转染HepG2细胞并以潮霉素筛选，获得抗性克隆，命名为HepG2-RHBV。扩增细胞，收集第5、10、20、30、40代潮霉素抗性细胞培养上清，用ELISA法检测HBV 特异抗原HBeAg、HBsAg的表达情况。各代细胞均能表达HBsAg和HBeAg，且随着细胞培养天数的延长，培养液中HBsAg和HBeAg含量逐渐增高。

2、细胞内 HBV 病毒颗粒 DNA 的提取及 Southern 印迹检测 HBV DNA

潮霉素抗性细胞接种在 60mm 平皿中，每皿细胞量为 1.8×10^6 ，培养 3d 后的细胞以冰预冷的 PBS 洗 2 遍。以裂解液(10mM Tris, pH 7.9, 1mM EDTA, 50mM NaCl, 1% NP40, 8% 蔗糖)裂解细胞，离心后保留上清，加入 35% PEG8000/1.75mol/L NaCl 浓缩裂解液中的 HBV 核心颗粒，并以 DNase I、RNase A 处理，以确保完全降解可能残留的 pREP-HBV。病毒核心颗粒以 SDS/蛋白酶 K 消化 12h，饱和酚、酚/氯仿各抽提 1 次，乙醇沉淀病毒 DNA 并溶于 20 μ l 去离子水。提取的 HBV DNA 于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离，常规虹吸转移至尼龙膜。以随机引物法制备探针，所用模板为全长 HBV DNA，以 32 P-dCTP 标记。核酸杂交按常规方法进行。结果显示第 5、10、20、30、40 代潮霉素抗性细胞均可见明显的杂交拖带，说明存在 HBV DNA 复制中间体，提示获得的潮霉素抗性细胞内有 HBV 复制。条带密度扫描显示各代细胞的杂交信号相对强度分别为 20.86、11.04、16.98、19.68、10.72。

3、电镜检测HBV颗粒

取潮霉素抗性细胞培养上清液约 20ml, 8000rpm (HITACHI R21A Rotor) 离心 30min, 取上清。在超速离心管底部先加入 1ml TNE 垫液(10mM Tris, pH7.4, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 20% Sucrose), 缓慢注入上述离心后的上清, 经 40000 rpm (Beckman Optima LE-80K 超速离心机, NVT65 Rotor) 4°C 离心 5 h, 弃上清, 沉淀加入 50 μ l PBS 重悬后作磷钨酸负染, 在电镜下检查病毒颗粒情况, 可见成簇的直径约为 42 nm 左右的 HBV 样颗粒以及直径为 22~26 nm 的球形颗粒。

本发明乙型肝炎病毒细胞株HepG2-RHBV的构建所得到的人肝癌细胞株HepG2-RHBV, 已保存到中国典型培养物保藏中心, 地址为中国 武汉 武汉大学, 保藏日期为2006年11月30日, 编号CCTCC NO: C200635, 该生物材料分类命名为人肝癌细胞株HepG2-RHBV (ren gan ai xi bao zhu HepG2-RHBV)。

本发明的有益效果是: 由于本发明构建HBV自主复制的肝细胞株, 使HBV在HepG2细胞中不仅能长期复制、表达特异性抗原及产生病毒颗粒, 而且作为模板的HBV DNA 以重组DNA方式游离于细胞染色体外, 从而研究HBV对HepG2细胞的总体影响, 分析HBV的可能致病机制, 为临床治疗提供指导和依据。

附图说明

以下结合附图及实施例对本发明进行进一步的描述。

图1 重组载体pREP-HBV构建过程。

图1示片段A从质粒pSEAP2- Basic中扩增, 片段B从#56-mut HBV DNA以BamH I 和Xba I 双酶切获得, 片段C以Xba I 和Rsr II 双酶切p56-mut, 片段D从#56-mut HBV DNA 中扩增, A、B、C、D四个片段与切除表达元件pREP10载体连接后得到pREP-HBV。

图2 是图1的1.2倍体HBV组成结构。

图3 重组载体pREP-HBV酶切鉴定结果。

图3中1为Sal I 切除表达盒的载体pREP10，为8.2kb；2为BamH I 酶切的pREP-HBV，分别为8.9kb和3.2kb；3为Sal I 酶切的pREP-HBV，分别为8.2kb和3.9kb；M为λ DNA/HindIII DNA Marker。

图4 不同代数 HepG2-RHBV 细胞及 HepG2.2.15 HBsAg 表达情况。

图4 中横座标为时间，纵座标为 HBsAg (P/N 比值)，不同图示代表不同代数细胞，◆—第5代 ■—第10代 ▲—第20代 ▨—第30代 ★—第40代 ◆—HepG2.2.15

图5 不同代数 HepG2-RHBV 细胞及 HepG2.2.15 HBeAg 表达情况。

图5 中横座标为时间，纵座标为 HBeAg (P/N 比值)，不同图示代表不同代数细胞，◆—第5代 ■—第10代 ▲—第20代 ▨—第30代 ★—第40代 ◆—HepG2.2.15

图6 HepG2-RHBV 细胞克隆 southern blotting 检测结果。

图6 中 1、2、3、4、5 分别代表第 5、10、20、30、40 代潮霉素抗性细胞，M 为 DNA Marker

图7 浓缩的细胞培养上清病毒颗粒电镜检测结果 (bar 为 100nm)。

具体实施方式

实施例 1:

请参阅各视图。

(一) 试剂

p56 为 pUC18 重组载体，含全基因组 HBV DNA；分离自慢性乙型肝炎患者（男性，42 岁），编号#56，长 3215bp，基因型 B，GeneBank 登录号 AF100309，该 HBV DNA preS2 起始密码发生变异，为 CTG。p56-mut 为 p56 突变体，将#56 HBV DNA 的 preS2 起始密码由 CTG 定点突变成 ATG。HepG2 细胞及

HepG2.2.15 细胞购自 ATCC, 均以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养。

(二) 构建 1.2 倍体 HBV DNA 重组真核表达载体 (pREP-HBV 构建过程见图 1)

1. 片段 A 的获取

以引物 TBf 和 TBr (TBf: 5'ACGCGTCGACAATAAAATATCTTTATTTTC 3'下划线为 Sal I 酶切位点, TBr: 5'CGCGGATCCAGAGAAATGTTCTGGCACC 3'下划线为 BamH I 酶切位点) 从质粒 pSEAP2- Basic 中扩增 0.1Kb 的 TB 片段 (Transcription Blocker), 总体积为 50ul, 反应体系如下: 反应体系如下: 10× High Fidelity PCR Buffer 5μl, 10mM dNTP mixture 1μl (0.2mM each), 50mM MgSO₄ 2μl (2mM), TBf(10μM) 1μl (0.2μM), TBr(10μM) 1μl (0.2μM), pSeap2-Basic(10μg/μl) 1μl(10μg), Platinum Taq High Fidelity 0.2μl(1.0U), ddH₂O 38.8μl, 共 50μl。用 ABI 9700 PCR 扩增仪扩增, 采用热启动方式, 待温度上升至 94°C 后加入聚合酶, 反应经 94°C 预变性 2 分钟后进入循环, 即, 94°C 变性 30 秒, 55°C 退火 30 秒, 72°C 延伸 30 秒, 扩增 30 个循环; 循环结束后 72°C 延伸 7 分钟。PCR 产物与 0.2 倍体积的 6×DNA 上样缓冲液混匀后上样, 1.5% 琼脂糖凝胶, 0.5×TBE 电泳缓冲液, 稳压 120V, 电泳 30 分钟。在紫外灯下将含目的基因片段的琼脂糖凝胶切下, 置离心管中, 用胶回收试剂盒回收 DNA 片段, 每 100mg 琼脂糖凝胶加入 300μl Solution I, 65°C 水浴 10 分钟, 每隔两分钟颠倒一次, 使胶完全溶解。混合液移入吸附柱中, 10000 g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体。吸附柱中加入 500μl Solution II, 10000 g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体。同法以 solution II 液重复洗柱一次。空柱 10000 g 离心 2 分钟, 将吸附柱置 1.5ml 离心管中, 开盖放置 2 分钟使乙醇完全挥发, 往吸附柱中央加入 25μl 灭菌三蒸水, 室温静置 5 分钟后 10000 g 离心 1 分钟洗脱 DNA。

PCR 回收产物以 Sal I、BamH I 酶切, 反应体系 20μl, 成份如下: PCR 回

收产物 14 μ l (0.5 μ g), 10 \times BamH I Buffer 2 μ l, 10 \times BSA 2 μ l, BamH I 1 μ l(20U), Sal I 1 μ l(20U), 共 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h, 酶消化产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后回收(方法同前), 该片段记为 A。

2.片段 B 的获取

以 Sap I 完全酶切 p56-mut, 反应体系 100 μ l, 成份如下: p56-mut 60 μ l (10 μ g), 10 \times Buffer4 10 μ l, Sap I 5 μ l(10U), ddH₂O 25 μ l, 共 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h, 酶消化产物经 0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收 3.2kb 的片段即完整的全基因组 HBV DNA (方法同前); 回收产物进行自身连接, 反应体系 20 μ l, 成份如下: 酶切回收产物 17 μ l (5 μ g), 10 \times Ligase Buffer 2 μ l, Ligase 1 μ l(1U), 共 20 μ l, 4 $^{\circ}$ C 连接 24h, 连接产物用 DNA 纯化试剂盒纯化, 加入 250 μ l Solution I, 混合液移入吸附柱中, 10000 g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体; 吸附柱中加入 500 μ l Solution II, 10000 g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体; 同法以 solution II 液重复洗柱一次; 空柱 10000 g 离心 2 分钟, 将吸附柱置 1.5ml 离心管中, 开盖放置 2-3 分钟使乙醇完全挥发, 往吸附柱中央加入 25 μ l 灭菌双蒸水, 室温静置 5 分钟后 10000 g 离心 1 分钟洗脱 DNA; 获得的环状 HBV DNA 记为#56-mut HBV DNA, 以 BamH I 和 Xba I 双酶切, 反应体积 20 μ l, 体系如下: #56-mut HBV DNA 14 μ l (0.5 μ g), 10 \times Buffer2 2 μ l, 10 \times BSA 2 μ l, BamH I 1 μ l(20U), Xba I 1 μ l(20U), 共 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h, 酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后回收约 2.0Kb 片段(方法同前), 该片段记为 B。

3.片段 C 的获取

以 Xba I 和 Rsr II 双酶切 p56-mut, 反应体积 20 μ l, 体系如下: p56-mut 4 μ l (0.5 μ g), 10 \times Buffer4 2 μ l, 10 \times BSA 2 μ l, Rsr II 1 μ l(4U), Xba I 1 μ l(20U), ddH₂O 10 μ l, 共 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h, 酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后回收约 1.3Kb 片

段(方法同前), 该片段记为 C。

4. 片段 D 的获取

用引物 PC 和 PD (PC:5'CATTTCATGGCTGCTAGGC 3', PD:5'ACGCGTCGACGAGA TCTCGAATAGAAGGAAAG 3',下划线为 Sal I 酶切位点) 从#56-mut HBV DNA 中扩增 0.6 Kb DNA, 总体积为 50ul, 反应体系如下: 10×High Fidelity PCR Buffer 5μl, 10mM dNTP mixture 1μl (0.2mM each), 50mM MgSO₄ 2μl (2mM), PC(10μM) 1μl (0.2μM), PD(10μM) 1μl (0.2μM), #56-mut HBV DNA (0.12μg/μl) 1μl (0.12μg), Platinum Taq High Fidelity 0.2μl (1.0U), ddH₂O 38.8μl, 共 50μl, PCR 扩增条件同前, 1.5%琼脂糖凝胶电泳后回收约 0.6 Kb 片段(方法同前), 并以 Rsr II 酶切, 反应体积 20 μl, 体系如下: PCR 回收产物 17μl (1.5μg), 10×Buffer4 2μl, Rsr II 1μl(4U), 共 20μl, 37°C 水浴 16h, 酶消化产物经 DNA 纯化试剂盒纯化(方法同前), 纯化产物用 SalI 酶切, 反应体积 20 μl, 体系如下: 纯化产物 15μl (0.5μg), 10×Sal I Buffer 2μl, 10×BSA 2μl, Sal I 1μl(20U), 共 20μl, 37°C 水浴 16h, 酶消化产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后回收约 0.4Kb 片段(方法同前), 该片段记为 D。

5. pREP10 载体的酶切

以 Sal I 切除 pREP10 载体上的真核表达盒相关片段, 包括 CMV 启动子、多克隆位点、SV40 加尾信号等, 反应体积 20 μl, 体系如下: pREP10 2μl (0.5μg), 10×Sal I Buffer 2μl, 10×BSA 2μl, Sal I 1μl(20U), ddH₂O 13μl, 共 20μl, 37°C 水浴 16h, 酶消化产物经 0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收约 8.2 Kb 载体片段(方法同前)。

6. 目的片段与载体的连接及转化

以 Sal I 切除 pREP10 载体后回收的 8.2 Kb 载体片段与上述 A-D 四个片段连

接，构建重组载体 pREP-HBV，反应体积 30 μl ，体系如下：载体片段 4 μl ，10 \times Ligase Buffer 3 μl ，Ligase 3 μl (3U)，片段 A 5 μl ，片段 B 5 μl ，片段 C 5 μl ，片段 D 5 μl ，共 30 μl ，4 $^{\circ}\text{C}$ 连接 24h，将连接产物加入 100 μl 感受态 Top10 细菌，冰浴 30 分钟，42 $^{\circ}\text{C}$ 热休克 2 分钟，快速置冰浴 2 分钟，加入 0.8ml LB 培养液，37 $^{\circ}\text{C}$ 、300rpm/分钟摇育 45 分钟；4000 g 离心 2 分钟收集细菌，将细菌涂布于含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的琼脂平板上，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 16 小时。

7. 筛选重组克隆

氨苄青霉素琼脂平板上挑取菌落，转种于 5ml 含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 培养液中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、300rpm/分钟摇育 8 小时。取 1.5ml 菌液用质粒小量抽提试剂盒提取质粒，4000g 离心 2 分钟收集细菌，加入 250 μl Solution I (25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA) 震荡重悬细菌，加入 250 μl Solution II (0.2N NaOH, 1%SDS)，颠倒混匀至菌液变清，加入 350 μl Solution III(3M KAc, pH5.5)，混匀。12000 g 离心 10 分钟，上清移入吸附柱内，12000 g 离心 1 分钟，弃收集管内的液体，加入 500 μl SolutionIV，12000 g 离心 1 分钟，弃收集管内的液体，加入 650 μl Solution V，10000g 离心 1 分钟，弃收集管内的液体，同法重复洗柱一次，弃收集管内的液体，空柱 12000 g 离心 2 分钟。在吸附柱中央加入 30 μl 灭菌三蒸水，12000 g 离心 1 分钟洗脱质粒 DNA，该质粒记为 pREP-HBV。

pREP-HBV 质粒含 A-D 四个外源 DNA 片段(见图 1 B)。A 为扩增自 pSEAP2-Basic 载体的 TB (Transcription Blocker) 片段；B、C、D 共同组成 1.2 倍体 HBV DNA，由此构成一个完整的 HBV 转录单位，其中 B 片段位于 HBV 基因组 1402nt-249nt，其 5' 端含 HBV 的核心启动子 (Basic Core promoter, BCP)，C 片段位于 HBV 基因组 249nt- 1573nt，D 片段位于 HBV 基因组 1573nt-2000nt，其 3' 端含加尾信号。取 5 μl 质粒 DNA，以 Sal I 酶切(37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 小时)，反应

体积为 20 μ l，体系如下：pREP-HBV DNA 5 μ l (0.5 μ g)，10 \times Sal I Buffer 2 μ l，10 \times BSA 2 μ l，Sal I 1 μ l (20U)，ddH₂O 10 μ l，共 20 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴 5 小时，产物以 1%的琼脂糖凝胶电泳。

pREP-HBV 经 Sal I 酶切出现两条 DNA 带(见图 2)，分别为 8.2kb 和 3.9kb，后者由 1.2 倍体 HBV DNA (3.8Kb) 及 TB 片段 (0.1Kb) 组成；经 BamH I 酶切后，在 8.9kb 和 3.2kb 处可见两条 DNA 带，后者为 1 单位长度的 HBV DNA。上述酶切结果与预期符合。相关序列以 ABI3770 型 DNA 自动荧光序列分析仪进行序列测定，测序引物如下：

P1: 5' AGACCACCAAATGCCCCTATC 3'

P2: 5' GGGTCACCATATTCTTGGGAAC 3'

P3: 5' CTCCGCGAGGACTGGGGACCC 3'

P4: 5' GCCATTTGTTTCAGTGGTTCG 3'

P5: 5' CGCATGCGTGGAACCTTTGTG 3'

PCR: 5' AAGCCCAGTAAAGTTTCCCAC 3'

Rep10-7: 5' GTTGTACCAACCAACTGAAG 3'

Reo10-1087: 5' GTCCACGACTGGACTGAGCAG 3'

测序结果证实 1.2 倍体 HBV DNA (3.8Kb) 与原模板序列完全一致。

(三) 质粒DNA抽提、定量及DNA转染

以 Qiagen Plasmid Midi Kits 大量抽提 pREP-HBV 质粒。菌株按 1:100 接种至 500ml LB 培养液(含氨苄青霉素 100 μ g/ml)，37 $^{\circ}$ C 震荡培养 16 小时。4000 g 离心 10 分钟收集细菌，加入 10ml P1 液，震荡重悬菌体。加入 10ml P2 液裂解细菌，置室温 3 分钟，使菌体完全裂解。加入 10ml P3 液，颠倒混合，冰浴 20 分钟。20000 g 离心 30 分钟，收集上清液体缓慢注入 Qiagen-tip500 纯化柱(已用 10ml QBT 缓冲液平衡)，待样品滴完后用 30ml QC 缓冲液洗柱两次，后用 15ml QF 缓冲液洗脱 DNA。洗脱液中加入 10.5ml 异丙醇，20000g 离心 30 分钟，以 5ml 70%

乙醇漂洗 DNA 沉淀，42°C 温箱中干燥 5 分钟后，将 DNA 溶于 500 μ l 灭菌三蒸水。取所获 DNA 10 μ l，以紫外分光光度计测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 及比值，确定浓度为 0.459 μ g/ μ l，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.968。

HepG2 细胞以含 10%小牛血清的 DMEM 培养 HepG2 细胞，传代之前以 0.25%胰酶、0.1%EDTA 进行消化，按 6×10^5 细胞 / 孔，接种至 6 孔细胞培养板。20 小时后，换新鲜的培养液(此时平皿中细胞覆盖已达 80-90%)，4 小时后进行转染。将 Qiagen 试剂盒大量抽提的质粒 pREP-HBV，以 Lipofectamine2000 转染细胞。转染的质粒 DNA 量与 Lipofectamine2000 用量比例为 1 μ g: 2 μ l。转染 16 小时后加入 250 μ g/ml 潮霉素筛选，每 3d 换培养液一次（含潮霉素），约 3 周后形成抗潮霉素细胞集落，挑取细胞集落置 24 孔板，继续用含潮霉素的培养液培养、扩增、冻存。

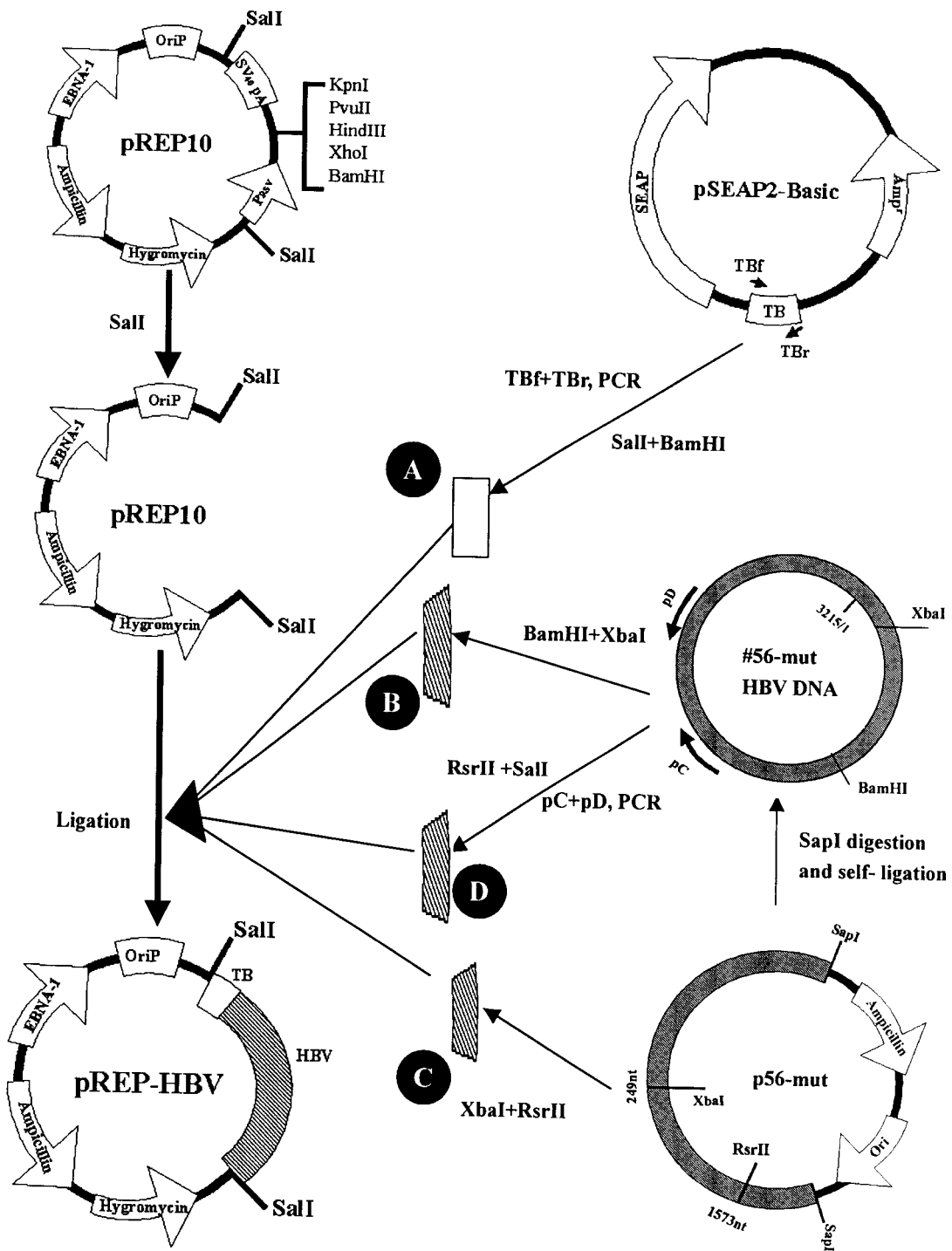


图 1

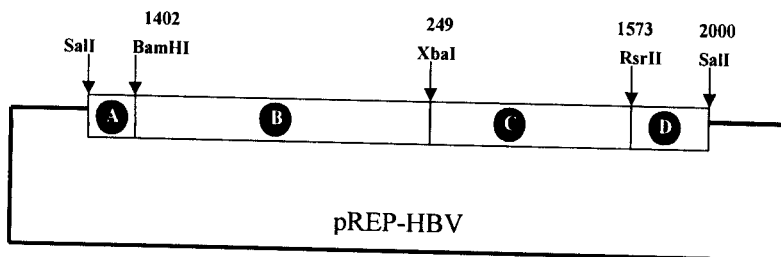


图 2

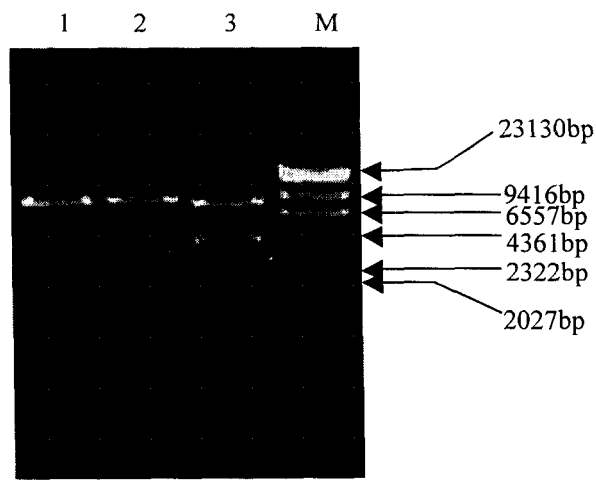


图 3

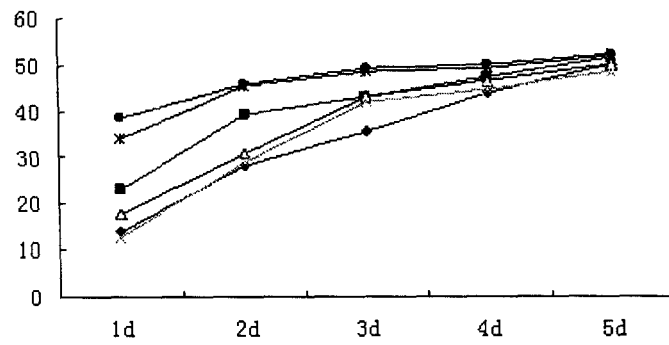


图 4

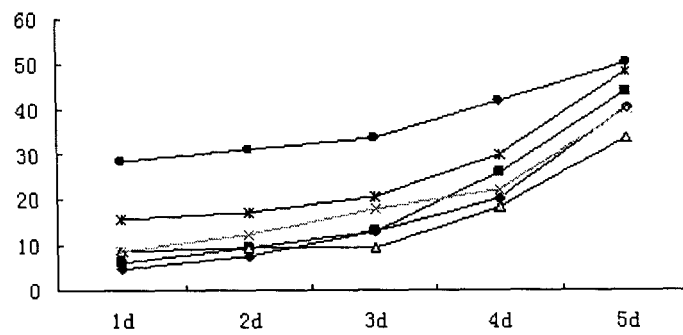


图 5

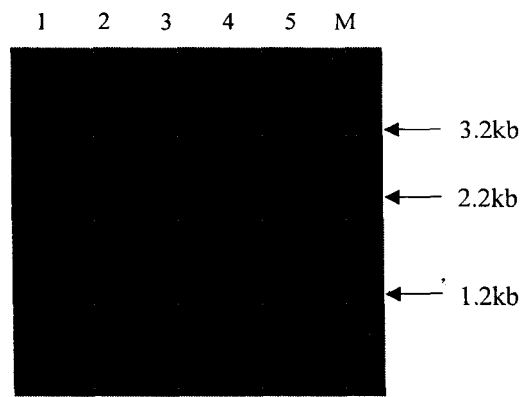


图 6



图 7

专利名称(译)	乙型肝炎病毒细胞株HepG2 - RHBV的构建		
公开(公告)号	CN101016536A	公开(公告)日	2007-08-15
申请号	CN200610135351.9	申请日	2006-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
[标]发明人	林旭 黄清玲 柏世玉 林建银		
发明人	林旭 黄清玲 柏世玉 林建银		
IPC分类号	C12N5/10 C12N15/09 C12N15/51 C12N15/79 G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/04		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种乙型肝炎病毒细胞株HepG2 - RHBV的构建, 属人体疾病的预防与治疗的前期研究。本发明构建能稳定表达HBV相关抗原并复制的HepG2细胞株, 作为模板的HBV DNA以重组DNA方式游离于细胞染色体外; 以HepG2 - RHBV细胞株应用于抗HBV药物的筛选; 以构建的HepG2 - RHBV细胞株为基础, 进一步研究HBV对HepG2细胞的影响。由于本发明构建HBV自主复制的肝细胞株, 使HBV在HepG2细胞中不仅能长期复制、表达特异性抗原及产生病毒颗粒, 而且作为模板的HBV DNA以重组DNA方式游离于细胞染色体外, 从而研究HBV对HepG2细胞的总体影响, 分析HBV的可能致病机制, 为临床治疗提供指导和依据。

