论著

文章编号:1000-5404(2011)16-1672-04

1.1倍全长HBV基因组克隆转染细胞系的建立

罗 强,苏怀彬,梁盼盼,袁作为,张文露,黄爱龙,胡接力 (400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室)

[摘要] **目的** 构建pneo-CH9/3091真核表达质粒,并建立其稳定表达的HepG2细胞系。**方法** 质粒pCH9/3091包含HBV1.1倍体和CMV启动子,将PCR扩增出的带有新霉素(neo)抗性的基因片段插入pCH9/3091构建成重组质粒pneo-CH9/3091。重组质粒经酶切,测序验证正确后,通过脂质体介导转入人肝癌细胞HepG2。G418筛选后,利用酶联免疫吸附法(ELISA)检测所得单克隆细胞培养上清液的HBV表面抗原(HBsAg)和e抗原(HBeAg),PCR检测细胞上清液的病毒颗粒,Western blot检测细胞内HBV核心蛋白(HBcAg)的表达,以及Southern blot检测细胞内核心颗粒HBV DNA的复制情况。**结果** 有3株细胞系培养上清HBsAg和HBeAg检测呈现阳性,且HBV C区片段可通过PCR扩增出来,Western bot结果提示只有细胞株HepG2-H7可以表达HBV核心蛋白。Southern blot结果说明此细胞株基因组中有HBV基因组的稳定整合,并且能在细胞内检测出HBV DNA复制中间体。**结论** 成功构建1株HBV稳定整合细胞株HepG2-H7,能持续产生HBV病毒颗粒。

[关键词] 乙肝病毒;HepG2细胞;稳定细胞株

[中图法分类号] R373.21;R394-33;R329.2 [文献标志码] A

Establishment of cloned cell line transfected with 1.1-unit-length HBV genome

Luo Qiang, Su Huaibin, Liang Panpan, Yuan Zuowei, Zhang Wenlu, Huang Ailong, Hu Jieli (Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct eukaryotic expression plasmid pneo-CH9/3091 and establish a HepG2 cell line with stable expression of the plasmid. **Methods** Neomycin resistance gene (neo) obtained by PCR was inserted into plasmid pCH9/3091 containing 1.1-unit-length HBV genome and CMV promoter to construct recombinant plasmid pneo-CH9/3091. The recombinant plasmid, after being verified by enzyme digestion and sequencing, was transferred into human hepatocarcinoma cell line HepG2 by liposome-mediated transfection. The transfected HepG2 cells were screened with G418 to obtain positive clones. The expression levels of HBV surface antigen (HBsAg) and HBV e antigen (HBeAg) in the culture supernatant of the monoclonal cells were measured by ELISA, and HBV particles were detected by PCR. The expression of HBV core protein (HBcAg) in the cells was analyzed by Western blotting, and HBV DNA replication was checked by Southern blotting. **Results** Out of six HepG2 cell lines that had positive expression of HBsAg and HBeAg in the supernatant, three showed PCR-amplified HBV core gene. Western blot results further showed that HBV core protein was expressed only in cell line HepG2-H7. HBV DNA replicative intermediates were detected by Southern blotting in cell line HepG2-H7, indicating that HBV genome had been stably integrated into cell line HepG2-H7. **Conclusion** Cell line HepG2-H7 with stably integrated HBV genome is established. The cell line can produce HBV particles continually.

[**Key words**] Hepatitis B virus; HepG2 cells; stable cell line

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81000732). Corresponding author: Hu Jieli, Tel: 86-23-68486780, E-mail: hujieli1977@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81000732)

[通信作者] 胡接力,电话:(023)68486780,E-mail: hujieli1977@163.com

乙型肝炎一直是社会公共健康问题[1],全球有3.5亿人因乙型肝炎病毒导致慢性感染,慢性感染常常会发展为肝硬化甚至肝癌[2-3]。由于乙肝病毒高度的种属及组织特异性[4],使HBV感染机制的研究受到一定的限制。虽然一些HBV体外感染模型已经建立,但是目前比较常用的HBV体外感染模型所用稳定细胞株为HepG2.2.15[5]。pCH9/3091质粒是1992年由德国Nassal[6]课题组构建的,主要包含1.1倍全长HBV基因和外源性巨细胞病毒(CMV)启动子[7]。本研究通过构建能表达新霉素抗性的重组质粒pneo-CH9/3091,采用稳定转染的方法,通过G418药物筛选,以及各种细胞和分子生物学手段进行检测,最后成功构建出1株可持续产生HBV病毒颗粒的稳定细胞株HepG2-H7,有望应用于抗病毒药物的筛选和HBV感染机制的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒pcDNA3.1购自美国Invitrogen公司;质粒pCH9/3091由第三军医大学西南医院全军感染病研究所兰林博士馈赠,德国Nassal[6]课题组构建;HepG2细胞购自美国ATCC中心并由本实验室保存;胎牛血清、MEM培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;G418购自德国Merck公司;GAPDH抗体、BCA蛋白定量试剂盒购自中国碧云天公司,兔抗HBc多抗购自丹麦Dako公司,二抗羊抗兔IgG单抗和二抗羊抗鼠IgG单抗均购自北京中杉金桥生物有限公司;Trizol试剂,脂质体2000购自美国Invitrogen公司;乙肝表面抗原和e抗原ELISA检测试剂盒购自上海实业科华生物有限公司;二甲基亚砜(DMSO)为美国Sigma公司产品;6孔板、24孔板、96孔板及培养瓶为美国Costar产品。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建及鉴定 PCR扩增pEGFP-n1质粒上的SV40-neo-polyA片段,设计的上下游引物5′端均引入*Sma* Ⅰ酶切位点。上游引物为:5′-TATCCCGGGTTTATGAACAAACGACCCA-3′,下游引物为:5′-TATCCCGGGGAGTCCTGAGGCGGAAAGA-3′。用*Sma* Ⅰ酶切PCR纯化产物及质粒pCH9/3091,将酶切纯化后的pCH9/3091载体与PCR产物用T_4 DNA连接酶(TaKaRa)连接。连接产物转化JM109感受态细胞,涂布含氨苄(Amp+)的LB琼脂糖培养板上,挑取单克隆,通过酶切鉴定及DNA测序,最终成功构建重组质粒pneo-CH9/3091。

1.2.2 转染及稳定表达细胞系的筛选 6孔板接种HepG2细胞,20 h后待汇合度达到80%左右,用脂质体2000(Invitrogen)将重组质粒pneo-CH9/3091转染至6孔板HepG2细胞中(3个孔),37 ℃,5% CO_2培养箱中培养。转染后6 h更换含10%胎牛血清的MEM培养基继续培养。24 h后将细胞传代至3个10 cm的细胞培养皿中,并换用含1 200 ng/μl G418的细胞培养液继续培养,每2天换1次培养液。待2~3周后细胞形成肉眼可见的细胞团,有限稀释至96孔板,使每孔接种单个细胞,在用含G418的细胞培养液培养的同时,取细胞上清液检测表面抗原表达情况。待细胞生长至较多时,将细胞依次传代至24孔板、6孔板以及100 ml培养瓶,扩大培养后于液氮冻存。

1.2.3 稳定细胞株培养上清HBV抗原的检测 吸取50 μl细胞上清于含有HBsAb或HBeAb抗体包被的96孔板内,加入50 μl酶反应液,37 ℃孵育30 min,用洗涤液反复洗涤5次待洗涤液完全干燥后依次加入反应液A和B各50 μl,37 ℃孵育15 min,加入C反应液50 μl,用酶标仪读取数据。

1.2.4 稳定细胞株培养上清液中病毒颗粒的检测 取2 μl细胞上清液作模板进行PCR扩增,以检测细胞上清是否有病毒颗粒。以pCH9/3091质粒为阳性对照,HepG2细胞的培养上清为阴性对照,设计上下游引物扩增大小为250 bp的HBc片段,上游引物为5′-AACGCTAGCTTGCCCAAGGTCTTAC-3′,下游引物为:5′-ATTAAGCTTGCTTGGAGGCTTGAAC-3′。PCR反应体系包含:PCR buffer (with Mg^{2+}) 2.5 μl,dNTP (2.5 mmol/L each) 2 μl,上下游引物(20 μmol/L)各1 μl,primerstar *Taq*聚合酶1 μl。反应条件为:预变性94 ℃ 5 min;变性94 ℃ 30 s,退火57 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 30 s,30个循环,延长72 ℃,10 min。扩增产物采用1%低熔点琼脂糖凝胶,含EB染色后凝胶成像仪观察并成像。

1.2.5 稳定细胞株核心蛋白的检测 用RIPA中性裂解液(混有1% PMSF)分别提取细胞总蛋白质,蛋白质定量后即取80 μg样品上样于12% SDS-PAGE胶,电泳,然后用PVDF膜于250 mA电转50 min。电转完毕,PVDF膜用封闭液(5%脱脂奶粉,0.1%吐温20,工作用TBST)封闭2 h。根据蛋白大小和抗体说明,将膜剪开并分别于4℃孵育兔抗HBc多抗和GAPDH抗体过夜。工作用TBST(0.1%吐温20,工作用TBS)洗膜3次(5 min/次)后,分别将膜常温孵育二抗羊抗兔IgG单抗和二抗羊抗鼠IgG单抗1 h。再次洗膜后进行ECL显色压片,洗片。

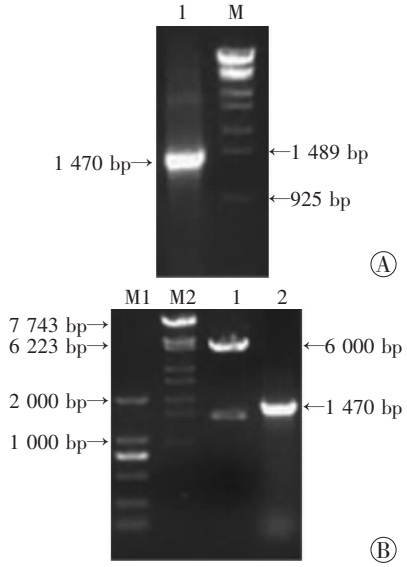
1.2.6 稳定细胞株胞内核心颗粒和胞内基因组HBV DNA杂交的检测 细胞内核心颗粒HBV DNA提取:用细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl 8.0,1 mmol/L EDTA,1% NP-40,50 mmol/L NaCl,8%蔗糖)裂解细胞,12 000 × *g*离心2 min,收集上清,然后用35%的PEG8000沉淀病毒核心颗粒,4 ℃ 12 000 × *g*离心10 min后弃去上清。用DNase Ⅰ(TaKaRa)消化沉淀中的残留质粒,37 ℃孵育4 h,Proteinase K(Promega) 45 ℃消化过夜。经2次酚氯仿抽提,无水乙醇沉淀,75%乙醇洗涤后,将得到的HBV DNA溶于8 μl超纯水中。HBV DNA用Southern blot检测,具体操作步骤详见文献[6],所用试剂盒为地高辛标记和检测试剂盒(Roche)。

细胞内基因组提取:用Wizard®基因组DNA纯化试剂盒(Promega)提取细胞内基因组DNA,操作按产品说明书进行,将提取到的3份约20μg基因组DNA分别经以下3组酶切处理:①*Eco*R,*Hind* Ⅲ;②*Sal* Ⅰ,*Hind* Ⅲ和*Eco*R Ⅰ;③*Sal* Ⅰ,*Hind* Ⅲ。质粒pCH9/3091含有*Sal* Ⅰ和*Eco*R Ⅰ两个酶切位点,不含*Hind* Ⅲ酶切位点。细胞株HepG2基因组含有*Hind* Ⅲ酶切位点,不含*Sal* Ⅰ和*Eco*R Ⅰ两个酶切位点。用高效PCR纯化试剂盒(Roche)纯化酶切产物后用8 μl超纯水定容,作Southern blot检测。

2　结果

2.1　重组质粒成功构建

以pEGFP-n1为模板,PCR扩增SV40-neo-polyA基因片段,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析后,片段大小为1 470 bp,与预期大小相符,见图1A。随后将纯化酶切后的SV40-neo-polyA基因片段通过连接方法插入到酶切纯化后的pCH9/3091载体上的SmaI克隆位点上。重组质粒pneo-CH9/3091用SmaI单酶切后经琼脂糖凝胶电泳可见约1 470 bp和6 000 bp处有明显条带,与预期相符,见图1B。后经DNA测序证实SV40-neo-polyA基因片段已正向插入质粒pCH9/3091中。由于目的片段上带有完整的SV40启动子和polyA片段,故而重组质粒pneo-CH9/3091能表达新霉素抗性。



A:pEGFP-n1质粒上PCR扩增neo片段　M:λ-EcoT14 I标准;1:PCR结果;B:pneo-CH9/3091质粒经*Sma* I酶切鉴定　M1:DNA标准(DL 2000);M2:λ-EcoT14 I标准;1,2:重组质粒pneo-CH9/3091单酶切结果

图1　重组质粒pneo-CH9/3091的构建

2.2　稳定细胞株的鉴定

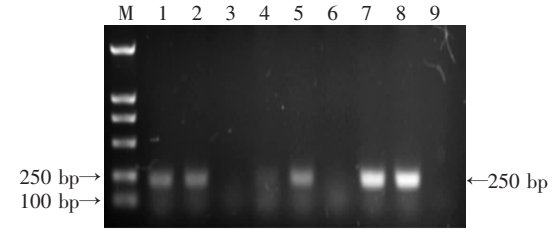
2.2.1　稳定细胞系上清HBV抗原表达的鉴定　用G418药物稳定筛选4周后,将肉眼可见的克隆团扩大培养,并取其上清分别检测HBsAg和HBeAg的表达情况。ELISA结果显示,细胞株HepG2-A1、HepG2-A4、HepG2-B6、HepG2-C1、HepG2-H7、HepG2-H11上清HBsAg与HBeAg表达较强,它们基因组整合有HBV基因的可能性较大,故将这6株细胞继续扩大培养(表1)。

2.2.2　稳定细胞系上清病毒颗粒和细胞内核心蛋白表达的分析　收集细胞培养上清,分别用PCR扩增HBV C区片段(图2),其中3株细胞HepG2-A4、HepG2-H7、HepG2-H11上清中可扩增出HBV C区250 bp大小的片段,提示可能有病毒颗粒的分泌。随后分别提取HepG2-A4、HepG2-H7、HepG2-H11细胞的总蛋白,另提取HepG2细胞的总蛋白做阴性对照。Western blot检测发现HepG2-H7细胞株在21 × 10^3处有明显的杂交条带,而HepG2-A4、HepG2-H11及HepG2细胞在21 × 10^3处均无杂交条带,检测不到目的蛋白表达(图3)。

表1　HBV稳定细胞株上清HBsAg、HBeAg分泌[$D(450)$, $\bar{x} \pm s$]

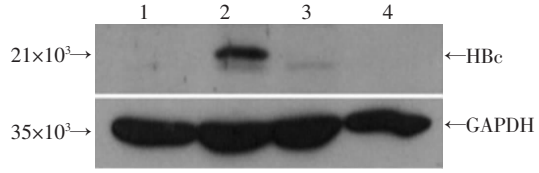
细胞系	HBsAg	HBeAg
HepG2-A1	1.552 ± 0.062	0.873 ± 0.040
HepG2-A4	0.871 ± 0.033	0.132 ± 0.073
HepG2-B6	0.538 ± 0.027	0.428 ± 0.026
HepG2-C1	0.410 ± 0.032	0.162 ± 0.046
HepG2-H7	0.895 ± 0.018	0.139 ± 0.021
HepG2-H11	1.086 ± 0.054	0.183 ± 0.019
阴性对照[a]	0.055 ± 0.009	0.050 ± 0.010
阳性对照	3.378 ± 0.050	3.340 ± 0.047

a:表示阴性对照,小于2倍阴性对照$D(450)$的值,结果为阴性



M:DNA标准(DL 2000);1~7:HepG2.2.1.5,HepG2-A4,HepG2-A1,HepG2-B6,HepG2-H11,HepG2-C1,HepG2-H7细胞上清液;8:pCH9/3091质粒;9:HepG2细胞上清液

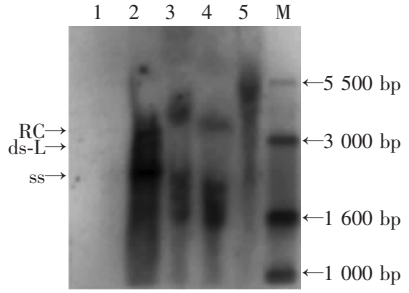
图2　PCR扩增细胞上清中C区片段



1~4:HepG2-H11、HepG2-H7、HepG2-A4、HepG2细胞总蛋白

图3　HepG2-H11、HepG2-H7、HepG2-A4细胞系HBV核心蛋白的检测

2.2.3　稳定细胞株胞内基因组HBV DNA整合及核心颗粒HBV DNA复制中间体的鉴定　细胞株HepG2-H7基因组经过不同的酶切处理后,可以杂交出多条带。虽然从图中无法判断看出杂交带的杂交带的位置及亮度,但是这足以说明HBV基因片段已稳定整合到HepG2-H7细胞株基因组中(图4)。另外,Southern blot检测出细胞内病毒核心颗粒HBV DNA复制中间体的存在,证实了细胞株HepG2-H7细胞支持HBV DNA的复制。



M:HBV DNA标准;1:HepG2细胞内病毒颗粒HBV DNA;2:HepG2-H7细胞内病毒颗粒HBV DNA;3~5:HepG2-H7细胞内基因组经不同的酶切处理后纯化的DNA

图4　HepG2-H7细胞系HBV复制的检测

3 讨论

乙型肝炎病毒有严格的宿主感染范围以及自身特异的生活周期[4],所以寻找针对乙型肝炎病毒发病机制和抗病毒治疗的基础研究所需要的实验模型显得尤为重要。一些与人类亲缘相近的动物,如黑猩猩等被用于病毒研究,但是由于其体积大,价格昂贵,有悖伦理等缺陷,故而应用性不大[8]。其他动物模型,诸如树鼩、土拨鼠、鸭等,虽然取得过一些进展[9],但是与人类亲缘性不高,故而不能完全代表HBV的研究结果。

近几年HBV感染的体外细胞模型越来越受研究者青睐。HepG2.2.15细胞作为国内外公认的HBV全基因稳定表达细胞系,能支持HBV的复制,分泌感染性病毒颗粒,但其整合的HBV DNA由内源性启动子启动前基因组RNA(pgRNA)转录,复制能力要低于一些外源高效的启动子,所以其表达水平可能偏低[9]。本研究所用的pCH9/3091质粒是包含*Sal* Ⅰ和*Sma* Ⅰ克隆位点的1.1倍体全长HBV基因真核表达质粒,该质粒序列上的CMV启动子转录活性较高,而HBV pgRNA的产生主要依靠此启动子[10],这样就有利于提高HBV DNA的复制效率。同时CMV较强的启动活性及较少的细胞选择性,有可能使得HBV DNA复制不再局限于肝源性细胞。

本研究通过构建重组质粒pneo-CH9/3091使其能表达新霉素抗性,然后将此重组质粒稳定转染到HepG2细胞中,在G418药物作用下筛选阳性克隆。由于重组质粒没有进行线性化,故转染时它是随即整合到细胞基因组中的[11]。在药物筛选过程中,有的克隆子基因组中只整合有新霉素抗性基因,有的整合有新霉素抗性基因和部分HBV基因片段。这就解释了为什么细胞株HepG2-C1、HepG2-A1、HepG2-B6、HepG2-H11、HepG2-A4通过ELISA检测出强阳性的HBsAg和HBeAg,PCR扩增出细胞株HepG2-H11、HepG2-A4细胞上清液HBV C区片段,但是经过Western blot证实它们并不是我们最终想得到的稳定整合细胞株。根据文献[4-5,12-13]报道,用同一质粒稳定转染细胞株,获得的克隆子很多,且表现不一,需要通过有效的检测手段筛选出真正的阳性克隆,才能得到理想的细胞模型。

本实验数据表明构建的细胞株HepG2-H7可以产生HBV DNA复制中间体(RC、ds-L和ssDNA[12])。同时,通过对HepG2-H7细胞基因组进行不同的酶切处理,用HBV探针进行Southern blot检测,杂交出的条带说明HepG2-H7细胞中HBV基因已经稳定整合到细胞株基因组中,虽然我们并没有像HepG2.2.15细胞一样观察到HBV基因具体的拷贝数[5]。HepG2-H7细胞株稳定性检测提示传代培养1年左右细胞形态以及HBV DNA复制水平均无明显改变。稳定细胞株HepG2-H7的成功构建将为我们进一步研究HBV的生物学特性、生活周期以及复制调控[14]等提供一个良好的实验模型。

参考文献:

[1] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 215-229.

[2] Villa E, Fattovich G, Mauro A, *et al*. Natural history of chronic HBV infection: special emphasis on the prognostic implications of the inactive carrier state versus chronic hepatitis[J]. Dig Liver Dis, 2011, 43(Suppl 1): S8-S14.

[3] 杨雨晗, 邓缅. Caveolin-1的低表达与乙型肝炎病毒感染相关肝细胞癌的关系研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(7): 715-718.

[4] Gripon P, Rumin S, Urban S, *et al*. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(24): 15655-15660.

[5] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(4): 1005-1009.

[6] Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly[J]. J Virol, 1992, 66(7): 4107-4116.

[7] Davis M G, Huang E S. Transfer and expression of plasmids containing human cytomegalovirus immediate-early gene 1 promoter-enhancer sequences in eukaryotic and prokaryotic cells[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1988, 10(1): 6-12.

[8] Glebe D. Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 8-13.

[9] Dandri M, Volz T K, Lutgehetmann M, *et al*. Animal models for the study of HBV replication and its variants[J]. J Clin Virol, 2005, 34(Suppl 1): S54-S62.

[10] Hu J L, Cui J, Deng X Y, *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.

[11] Stuchbury G, Munch G. Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA[J]. Cytotechnology, 2010, 62(3): 189-194.

[12] Sun D, Nassal M. Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus[J]. J Hepatol, 2006, 45(5): 636-645.

[13] Lucifora J, Durantel D, Belloni L, *et al*. Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector[J]. J Gen Virol, 2008, 89(Pt 8): 1819-1828.

[14] 万涛, 张小花, 张磊, 等. HBV对肝癌细胞中AKR1C1基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(3): 297-299.

(**收稿**:2011-02-28;**修回**:2011-04-08)

(编辑 王 红)