肝炎病毒学研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001313

一种构建 HBV 聚合酶特定位点多种突变的方法

刘　亚，杨柳青，张文露，黄爱龙，胡接力
（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】核苷(酸)类似物[neocleot(s)ide analogues,NUCs]在治疗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染的过程中常见的一个问题就是耐药的产生。耐药的产生与 HBV 逆转录酶(reverse transcriptase,RT)区特定位点突变具有直接关系。现有的体外表型分析方法存在固有的限制。本文提出一种构建 HBV 聚合酶特定位点多种突变的新方法，即位点特异性随机突变，通过一轮聚合酶链式反应扩增，在 RT 区特定位点引入多种突变形式，再结合 golden-gate 克隆法以及片段替换反应(fragment substitution reaction,FSR)将包含不同突变的 DNA 片段克隆到相应载体中以进行下一步分析。通过这种方法，构建了阿德福韦(adefovir,ADV)耐药位点 rt181 和 rt236 位点的多种突变形式。

【关键词】克隆；生物工程方法；核苷类似物；耐药；HBV 聚合酶
【中图分类号】R51　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-12-09

A method for constructing extensive mutagenesis of HBV polymerase

Liu Ya, Yang Liuqing, Zhang Wenlu, Huang Ailong, Hu Jieli
(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases Founded by Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】A common problem during long term administration of chronic hepatitis B with Neocleot(s)ide analogues(NUCs) is drug resistance. NUCs resistance has been attributed to mutations at specific sites in the reverse transcriptase domain of HBV polymerase. Currently used extensive mutagenesis assay based on plasmid transfection method has some disadvantages. Here, we developed an alternative method for extensive mutagenesis phenotype assay of HBV polymerase. This method combined a randomized mutation method and golden-gate or fragment substitution reaction(FSR) strategy developed previously. Using this way, we successfully constructed multiple mutations at rt181 and rt236, the well-known mutation sites related to ADV resistance.

【Key words】clone; biotechnology; neocleot(s)ide-analogues; HBV-polymerase; drug resistance

慢性乙肝病毒感染是一个全球性的公共卫生问题，全球约有 3.5 亿慢性乙肝病毒感染者。针对慢性乙肝病毒感染，临床上比较常用的手段是口服核苷酸类似物类药物。主要包括拉米夫定(lamivudine,LAM)，替比夫定(telbivudine,LdT)，阿德福韦(adefovir,ADV)，恩替卡韦(enticavir,ETV)，替诺福韦(tenofovir,TDF)5 种，通过竞争性结合乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)聚合酶发挥抗病毒作用。然而，这类药物的主要靶点是 HBV 聚合酶，无法干扰细胞核内的共价闭合环状DNA(cccDNA)，临床上常常需要长期用药以达到持续性地病毒抑制作用，与此同时，长期用药必然伴随耐药的产生[1]。

HBV 聚合酶包含 4 个不同的功能结构域，从 N 端到 C 端依次为 TP(terminal protein)、Spacer、RT(reverse transcriptase)、RH(C-terminal RNase H)区。其中，RT 区即逆转录酶区域，在以 PgRNA 为模板的病毒 DNA 合成过程中发挥重要作用。同时，其合成功能的发挥与结构密切相关，这一区域任何一个氨基酸替换都有可能引起聚合酶构象改变从而导致与核苷类药物亲和力下降[2-3]。拉米夫定是最早应用于临床的核苷类药物，其五年耐药率约为 70%，临床上常见的突变包括 rtM204V 或 rtM204I，同时可

作者介绍：刘　亚，Email：443835723@qq.com，
研究方向：乙肝病毒致病机理及治疗。
通信作者：胡接力，Email：hujieli1977@163.com。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1114.010.html
(2017-06-22)

能伴有 rtL180M 和(或)rtV173L 等氨基酸改变[4-5]；阿德福韦耐药常由 rtA181T/V 或 rtN236T 引起[6]；高水平的恩替卡韦耐药需要 3 个及以上位点突变。这些突变位点常发生在拉米夫定耐药突变 rt204 的基础之上，包括 rtT184、rtS202 和 rtM250 等[7]。尽管在替诺福韦 2008 年批准使用以来，临床上并未报道相关耐药病例，但有报道称某些突变如 rt194 可引起替诺福韦敏感性下降[8]。

临床上已发现的氨基酸突变类型有限，基于 HBV 的高水平复制及聚合酶容错特性，理论上每个位点氨基酸都有可能突变为野生型以外的任意类型。为什么这些突变型在临床上少见，这些突变类型与野生型相比对复制有怎样的影响均是研究者感兴趣的问题。Baldick 等[9]构建了恩替卡韦耐药相关位点(rtT184、rtS202 或 rtM250)的所有突变形式，其研究对恩替卡韦耐药机制进行了深入阐述。目前常用的体外表型分析方法都是建立在克隆构建及细胞转染基础之上。显然，在进行特定位点多种突变形式与耐药相关性分析以及广泛筛选，如新药临床应用前体外筛选已知突变位点不同氨基酸替换形式对药物的敏感性影响的过程中，这一克隆步骤无疑是费时费力且不适用于大量广泛筛选的。

因此，本研究提出了一种构建 HBV 聚合酶特定位点多种突变的新方法，即位点特异性随机突变，通过一轮聚合酶链式反应(polymerase chain reaction，PCR)扩增，在 RT 区特定位点引入多种突变形式，再结合 golden-gate 克隆法以及片段替换反应(fragment substitution reaction，FSR)将包含不同突变的 DNA 片段克隆到相应载体中以进行下一步分析。位点特异性随机突变即通过随机引物在突变热点区域引入随机突变，本实验通过随机引物 F181GG 和 R236M 在 ADV 耐药位点 rt181 和 rt236 引入含 2 个碱基位点的随机突变(NNT/NNC)。Golden-gate 克隆法是近年发展起来的 IIS 型限制性核酸内切酶(IIS restriction enzymes)介导的克隆策略[10]。由于 IIS 的切割位点在其识别位点之外，因此可以通过引物引入酶切识别位点，识别序列在酶切过程中将被切除，从而实现多个片段的无缝连接。FSR 即片段置换反应，是本实验室前期建立的一种构建基因重组体的新策略，其原理是将质粒上的一段序列(被替换片段，substituted fragment，SF)替换为目标序列(目标片段，target fragment，TF)[11]。当要替换的片段(mega-primers)与模板上相应片段同源性较高时，FSR有很高的替换效率。FSR 的原理类似于 stratagene 的定点诱变技术。在实践操作中，将一段位于 2 条引物间的序列(长度为一至数千碱基对)看成是“一个”突变，而这 2 条引物可与目标质粒上的相应区域退火，整个 DNA 片段可看作一对大引物。当该片段的 2 条链分别与质粒模板退火后，DNA 多聚酶开始以质粒为模板合成 2 条新链，这 2 条新合成的链可形成类似含有缺口的质粒结构分子。在用 *Dpn* Ⅰ消化去除原质粒模板后，将反应产物转化大肠杆菌，即可获得含有替换片段的克隆。

本实验通过位点特异性随机突变结合 golden-gate 克隆法构建了 ADV 耐药相关位点 rt181 的 13 种突变形式，编码 13 种不同的氨基酸，FSR 反应构建了 rt236 的 14 种突变形式，编码 13 种不同的氨基酸。相对于传统的一次构建一种突变的克隆方法，本方法简便高效、成本更低，适用于其他同类型的 DNA 突变构建。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 感受态细菌由大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 制备，Lentipol-D 是本实验室之前构建的可表达 HBV(基因型 D 型)聚合酶基因的慢病毒载体，其结构如图 1 所示。

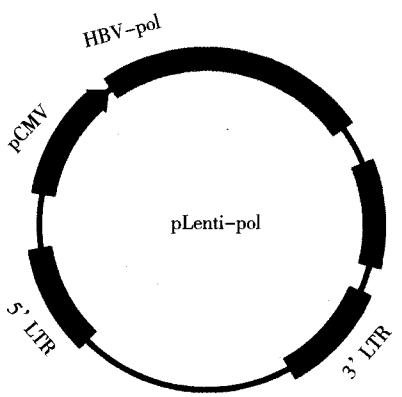


图 1 重组载体质粒结构图

Fig.1 Structure of recombined vector

1.1.2 酶类及主要生化试剂 2×PrimerSTAR HS Mix 为 Takara 公司生产；胶回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品；PCR产

物纯化试剂盒为 Roche 公司产品；*BsmB* Ⅰ为 Thermo Scientific 公司产品；T7 DNA ligase 为 Enzymatics 公司产品；内切酶 *Dpn* Ⅰ为 Promega 公司产品。本文所用引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Primer for PCR

引物名称	引物序列
lenti6744FGG	TGCGTCCGTCTCAAGGTTTCCCGACTGGAAAGC
lenti6747R1GG	TGCGTCCGTCTCAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
F181GG	TGCGTCCGTCTCCTCTCCTGNNTCAGTTTACTAGTGCCA
R181GG	TGCGTCCGTCTCAGAGAAACGGGCTGAGGCCCACTCCCAT
lenti4165F1GG	TGCGTCCGTCTCAGAAAACCCTG GCGTTACCCA ACT
lenti4168R1GG	TGCGTCCGTCTCATTTCCCAGTCACGACGTTGT
lenti6744F1	AGGTTTCCCGACTGGAAAGCGAATAACCCC
R236M	ATCTTTTTGTTTTGTTAGGGNNTAAATGTATACCCAGAGACA

1.2 方法

1.2.1 克隆片段扩增 lentipol-D 质粒片段扩增分为 3 段，3 个片段均由引物引入 *BsmB* Ⅰ酶切位点以实现酶切之后片段之间能通过 4 个碱基配对实现无缝连接。包含 rt181 特定突变的 DNA 片段由引物 F181GG 和 lenti4168R1GG 扩增得到，另外 2 个片段分别由 lenti4165F1GG 和 lenti6747R1GG，lenti6744F1GG 和 R181GG 扩增得到。反应体系：10 ng lentipol-D 质粒模板，引物均为 10 μmol/L，各 0.4 μL，2×PrimerSTAR HS Mix 10 μL，灭菌超纯水补齐体积至 20 μL。反应条件：95 ℃预变性 3 min，95 ℃ 10 s，65 ℃(-1 ℃/循环)15 s，72 ℃ 2.5 min，10 个循环，95 ℃ 10 s，55 ℃ 15 s，72 ℃ 2.5 min，25 个循环。rt236 克隆片段扩增：rt236 克隆片段由引物 Flenti6744F1 和 R236M 扩增得到，模板、反应体系及条件同前。

1.2.2 扩增片段胶回收纯化 上述 DNA 片段扩增后凝胶电泳，目的片段胶回收纯化。胶回收操作按厂商说明书进行。

1.2.3 克隆构建 Golden-gate 克隆 rt181：上述胶回收产物片段做 golden-gate 反应。反应体系：*BsmB* Ⅰ 0.75 μL，T7 ligase 0.25 μL，Tango buffer 1 μL，DTT(10 mmol/L)1 μL，ATP(10 mmol/L)1 μL，片段各 1 μL(60 ng/μL)，灭菌超纯水补齐体积至 10 μL。由于 lentipol 载体本身包含一个 *BsmB* Ⅰ酶切位点，因此在 golden-gate 反应条件结束后增加一步连接反应。反应条件：37 ℃ 4 min，25 ℃ 4 min，循环 20 次。25 ℃ 30 min，80 ℃ 20 min 灭活反应。Golden-gate 产物转化 DH5α 感受态细菌，涂板。FSR 克隆 rt236：上述胶回收产物片段做 FSR 反应。反应体系：5×PS buffer 10 μL，Dntp(2.5 mmol/L)4 μL，PrimeStar DNA 聚合酶(2.5 U/μL)1.5 μL，lentipol-D 质粒(21.7 ng/μL)2 μL，片段 30 μL(184.8 ng/μL)，灭菌水补齐体积至 50 μL。反应条件：95 ℃预变性 3 min，95 ℃ 15 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 3 min，35 个循环。

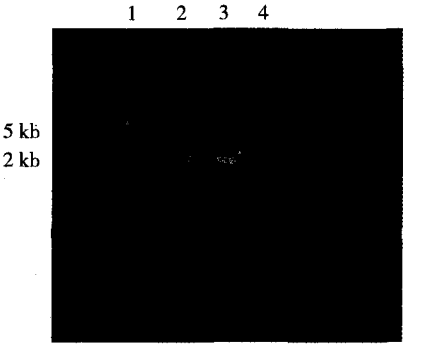
以上反应产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化，纯化操作按厂商说明书进行。纯化后的产物，用 *Dpn* Ⅰ酶切，反应体系如下：10×buffer B 4 μL，*Dpn* Ⅰ 1 μL，纯化产物 35 μL，37 ℃ 1 h。酶切产物转化 DH5α 感受态细菌，涂板。

1.2.4 克隆鉴定 挑取平板上过夜培养的菌落至 EP 管中，在含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中 37 ℃培养 3 h，直接取部分菌液测序鉴定。剩余菌液 20%灭菌甘油-20 ℃保存以备后续根据测序结果挑选正确克隆扩大培养。

2 结 果

2.1 目的片段扩增

以 lentipol-D 质粒为模板的 181 片段扩增分为 3 段，3 个片段均由引物引入 *BsmB* Ⅰ酶切位点以实现酶切之后片段之间能通过 4 个碱基配对实现无缝连接。包含 rt181 特定突变的 DNA 片段由引物 F181GG 和 lenti4168R1GG(1.7 kb 左右)扩增得到，另外 2 个片段分别由 lenti4165F1GG 和 lenti6747R1GG(2.5 kb 左右)，lenti6744F1GG 和 R181GG(5.1 kb 左右)扩增得到。含 rt236 突变的片段由 lenti6744F1GG 和 R236M 扩增得到，大小约为 5.3 kb，电泳结果如图 2 所示。



1：lenti6744F1+R181GG；2：F181GG+lenti4168R1GG；
3：lenti4165F1GG+lenti6747R1GG；4：lenti6744F1GG+R236M

图 2 PCR 片段电泳图

Fig.2 Electrophoresis of PCR products

2.2 重组克隆测序结果

扩增后的 DNA 片段分别通过 golden-gate 连接反应(rt181)及 FSR 替换反应(rt236)，将特定位点突变引入载体中，电击转化感受态细菌后，挑菌送测序，测序结果显示通过随机引物的方式，成功将不同突变引入 RT 特定位点，部分测序比对结果如图 3 所示。

Rt181 突变，挑取 40 个克隆测序，其中 25 个测序成功，共得到 13 种突变形式，编码 13 种不同的氨基酸替换形式。不同氨基酸替换形式所对应的克隆数分别为 0-5，测序结果见表 2。Rt236 突变，挑取 60 个克隆测序，其中 34 个测序成功，共得到 14 种突变形式，编码 13 种不同的氨基酸替换形式。不同氨基酸替换形式所对应的克隆数分别为 0-6，测序结果见表 3。

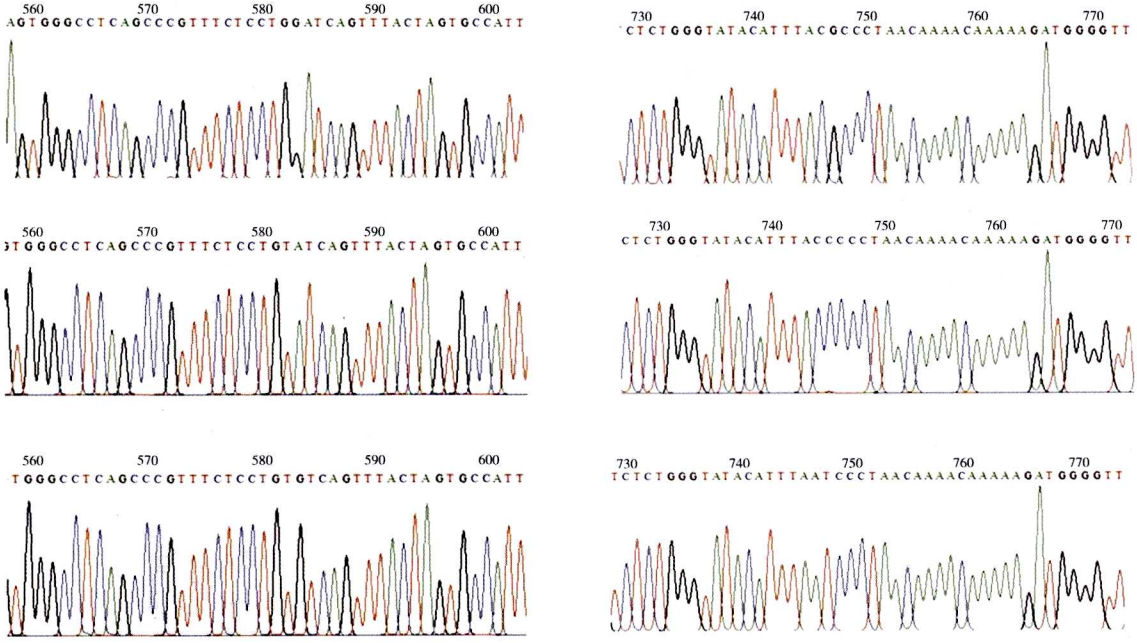


图 3　重组克隆测序结果

Fig.3　Sequencing of recombined clones

表 2　Rt181 克隆测序结果

Tab.2　Sequencing results of Rt181

克隆数量	突变类型（NNT）	氨基酸替换
1	GCT	Wild-typeA181
5	GAT	A181D
2	GGT	A181G
1	GUT	A181V
2	CGT	A181R
3	CUT	A181L
0	CAT	A181H
0	CCT	A181P
1	AAT	A181N
1	AGT	A181S
2	AUT	A181I
2	ACT	A181T
2	UAT	A181Y
2	UGT	A181C
0	UCT	A181S
1	UUT	A181F

表 3　Rt236 克隆测序结果

Tab.3　Sequencing results of Rt236

克隆数量	突变类型（NNT）	氨基酸替换
3	AAC	Wild-type N236
1	AGC	N236S
1	ACC	N236T
3	AUC	N236I
2	CAC	N236H
3	CGC	N236R
3	CCC	N236P
0	CUC	N236L
1	GAC	N236D
1	GGC	N236G
6	GUC	N236V
1	GCC	N236A
2	UGC	N236C
6	UUC	N236F
1	UCC	N236S
0	UAC	N236Y

3　讨　论

临床上已经明确的耐药相关 HBV 聚合酶 RT 区热点区域突变种类较少，那些临床少见的突变在以准种形式进行的 HBV 感染过程中是本身不存在还是因为目前监测手段精确度有限未能检出，各种不同突变形式与野生型相比复制能力及耐药性存在怎样的差别，在不断开发应用的新型抗病毒药物筛选压力下能否成为优势耐药种群，这些问题的研究均需要体外表型分析提供直接证据，而体外表型分析的第一步就涉及克隆构建。传统克隆构建方式费时费力，且不适用于大量克隆构建。

本研究中提出了一种构建 HBV 聚合酶特定位

点多种突变的新方法，即位点特异性随机突变，再结合 golden-gate 克隆法或者片段替换反应（fragment substitution reaction，FSR）将包含不同突变的 DNA 片段克隆到相应载体中以进行下一步分析。选择已明确的 ADV 耐药位点 rt181 和 rt236，分别用 2 种不同的克隆方法，成功地将多种突变形式通过一轮反应程序克隆到慢病毒载体上。与传统的位点直接突变方式相比，本方法具有更简便高效的优势。本方法的主要特点在于：①通过位点特异性随机突变，经过一轮 PCR 反应扩增，可在 RT 区任意位点引入多种突变形式；②由于不同突变之间只有 2 个碱基的差异，胶回收及克隆到载体的过程全部以混合形式进行；③通过 golden-gate 连接法实现多个片段的无缝连接；FSR 片段置换反应将质粒上的一段序列替换为目标序列；④直接挑取单克隆细菌测序。本实验通过一轮反应分别获得 rt181 和 rt236 的 13/14 种突变，若按传统方法则需进行十余次克隆过程，无疑本实验方法更简单高效。

通过测序结果可以看出部分突变在克隆过程中缺失（CAU/CCU/UCU 对应 rtA181H/P/S；CUC/UAC 对应 rtN236L/Y），这可能是由于随机引物种相应碱基分布不均，也可能是由于挑取的测序克隆数量有限而致。2 种克隆方法较传统方法均具有操作简便、高效等优点，FSR 仅适用于同源性较高的片段置换，且酶切步骤可能存在模板消除不完全从而导致假阳性。Golden-gate 不受片段类型的影响，可适设计多个酶切位点，将目的载体分成多个片段进行扩增，通过酶切连接实现多个片段的连接，操作步骤更加简便，且不存在原始模板干扰，阳性率更高。另外，在 golden-gate 克隆过程中，载体本身存在的 *BsmB* Ⅰ 酶切位点虽然在反应过程中会被酶切割，但通过延长连接反应时间，被切开的载体可以重新被连接，不会对片段连接反应造成影响。显然，这种快速构建多种克隆的方式在进行特定位点多种突变形式与耐药相关性分析以及广泛筛选的过程中更具优势，适用于不同突变形式组合克隆的构建及其他同类型的 DNA 突变构建。

参 考 文 献

[1] Lai CL, Dienstag J, Schiff E, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B[J]. Clinical Infectious Diseases, 2003, 36(6): 687-696.

[2] Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, et al. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 1996, 24(3): 714-717.

[3] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1593-1608.

[4] Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy [J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2009, 49(5S): 174-184.

[5] Das K, Xiong X, Yang H, et al. Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine(3TC) and emtricitabine(FTC)[J]. Journal of Virology, 2001, 75(10): 4771-4779.

[6] Lee YS, Suh DJ, Lim YS, et al. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2006, 43(6): 1385-1391.

[7] Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(9): 3498-3507.

[8] Kitrinos KM, Corsa A, Liu Y, et al. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2014, 59(2): 434-442.

[9] Baldick CJ, Tenney DJ, Mazzucco CE, et al. Comprehensive evaluation of hepatitis B virus reverse transcriptase substitutions associated with entecavir resistance[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2008, 47(5): 1473-1482.

[10] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5553.

[11] 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]. Journal of Virological Methods, 2009, 161(1): 63-69.

（责任编辑：张辉洁）